

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
19 avril 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/26667 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
A61K 35/32, C12N 5/08, 5/10, A61K 48/00

(FR). JAYANKURA, Marc [BE/BE]; Dries 26-28,  
B-1170 Bruxelles (BE).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02802

(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Cabinet Becker et As-  
sociés, 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:  
10 octobre 2000 (10.10.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Données relatives à la priorité:  
99/12711 12 octobre 1999 (12.10.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): UNI-  
VERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)  
[FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): SAIL-  
LANT, Gérard [FR/FR]; 8, sente des Bruyères, F-78170  
La Celle Saint Cloud (FR). KLATZMANN, David  
[FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris (FR). SALZ-  
MANN, Jean-Loup [FR/FR]; 70, rue Claude Bernard,  
F-75005 Paris (FR). BOGGIONE, Christophe [FR/FR];  
157, rue de Grenelle, F-75007 Paris (FR). BOYER,  
Olivier [FR/FR]; 100 bis, rue Ordener, F-75018 Paris

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avec revendications modifiées.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: TENOCYTE COMPOSITIONS AND PRODUCTION AND USES THEREOF

(54) Titre: COMPOSITIONS DE TENOCYTES, PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention relates to tenocyte cell compositions, especially human tenocyte cell compositions, to methods for producing them and to the use of these compositions for implanting tenocytes in vivo, for treating different pathologies. In particular, the invention relates to the production of suspensions of especially autogenous human tenocytes, to techniques for preserving them, to genetic modification of the same ex vivo or in vivo and to their use in vivo for restoring the ligament or tendon structures affected or more generally, for treating and repairing any clinically significant defect in the tendons, ligaments or other biological tissues containing tenocytes or a fibrous structure.

(57) Abrégé: La présente invention concerne des compositions de cellules ténocytes, notamment humaines, et des méthodes pour leur préparation. Elle concerne également l'utilisation de ces compositions pour l'implantation de ténocytes in vivo, pour le traitement de différentes pathologies. L'invention est plus particulièrement relative à la production de suspensions de ténocytes humains, notamment autologues, des techniques pour leur conservation, leur modification génétique ex vivo ou in vivo, et leur utilisation in vivo pour restaurer des structures ligamentaires ou tendineuses affectées ou, plus généralement, pour le traitement et la réfection de tout défaut cliniquement significatif des tendons, ligaments ou autres tissus biologiques comprenant des ténocytes ou une structure fibreuse.

US Appl No 10/526,753  
IDS Ref 3

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/26667 A1

## COMPOSITIONS DE TENOCYTES, PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne des compositions de cellules ténocytes, notamment humaines, et des méthodes pour leur préparation. Elle concerne également l'utilisation de ces compositions pour l'implantation de ténocytes in vivo, pour le traitement de différentes pathologies. L'invention est plus particulièrement relative à la production de suspensions de ténocytes humains, notamment autologues, des techniques pour leur conservation, leur modification génétique ex vivo ou in vivo, et leur utilisation in vivo pour restaurer des structures ligamentaires ou tendineuses affectées ou, plus généralement, pour le traitement et la réfection de tout défaut cliniquement significatif des tendons, ligaments, muscles ou autres tissus biologiques comprenant des ténocytes ou une structure fibreuse.

Le tendon est essentiellement composé de 30% de fibres de collagène et de 2% de fibres d'élastine, enveloppées dans une matrice extra-cellulaire contenant 68% d'eau. Les différents composants du tendon sont :

- les fibres de collagène de type I : composante majoritaire constituant 70% du poids sec du tendon. Leur disposition, parallèle aux contraintes mécaniques, est responsable de la résistance du tendon aux forces de traction.
- les fibres d'élastine, qui assurent la part d'élasticité du tendon.
- la matrice extra-cellulaire, composée de protéoglycanes, de glycoprotéines et d'eau, et
- une composante cellulaire, rare, principalement représentée par les ténocytes (fibroblastes différenciés des tendons, aponévroses et ligaments).

Le tendon est organisé en structures de taille croissante:

- Fibres de collagène : L'unité de base du collagène est constituée par le tropocollagène. Il s'agit d'une longue protéine de 200 nm sur 1,5 nm, principalement de type I, formée par l'assemblage de 3 chaînes alpha enroulées en triple hélice. Le tropocollagène résulte de la polymérisation de molécules de

procollagène secrétées par les ténocytes. L'assemblage de 5 unités de tropocollagène forme une fibrille de collagène. Plusieurs fibrilles parallèles, enveloppées par la matrice extra-cellulaire, forment une fibre de collagène (Fig. 1).

- 5 - Faisceaux de collagène : Les fibres de collagène se regroupent en faisceaux disposés dans l'axe du tendon. Les faisceaux sont séparés par un tissu conjonctif lâche, l'endotendon, contenant les éléments vasculo-nerveux et permettant le glissement entre faisceaux (Fig. 2).
- Le tendon proprement dit : La réunion des faisceaux, primaires et secondaires, constitue le tendon enveloppé par une membrane conjonctive, l'építendon (ou périténoníum).

Autour du tendon, les annexes sont constituées par le paratendon, tissu conjonctif lâche assurant le soutien du tendon, ou par les gaines fibreuse et synoviale assurant le maintien et le glissement du tendon. La gaine synoviale est formée de deux feuillets constituant un espace de glissement.

La vascularisation du tendon provient principalement de ses extrémités. Elle est assurée par des artérioles musculaires et périostées. Il existe également un apport vasculaire provenant du mésotendon ou du paratendon dont l'importance est moindre. Ainsi, le tiers moyen du tendon, mal vascularisé, constitue une zone critique au plan vasculaire, ce qui pourrait rendre compte de sa fragilité mécanique particulière.

Le tendon, tout comme les ligaments, est un tissu relativement fragile, qui subit de multiples altérations, soit de nature traumatique, soit liées au vieillissement.

25 Ainsi, la structure du tendon se modifie physiologiquement avec l'âge et peut expliquer la fragilisation observée lors du vieillissement (1). Les facteurs de fragilisation tendineuse sont la diminution du nombre de ténocytes, la diminution du nombre de fibres élastiques, la diminution de la qualité puis de la quantité des fibres de collagène, ainsi que, la diminution de la quantité de protéoglycanes et, par conséquent, du niveau d'hydratation.

Parmi les facteurs exogènes aggravant la fragilisation tendineuse, on note les microtraumatismes répétés (des microruptures apparaissent au-delà de 4% d'étirement du tendon), la prise d'androgènes (par l'augmentation du rapport

masse musculaire / tendon) et la prise de corticostéroïdes (par diminution de l'activité fibroblastique). La diminution, absolue ou relative, du nombre de ténocytes, ainsi que de leurs possibilités métaboliques, aboutit à une limitation de la régénération tendineuse. La faible vascularisation du tendon renforce ce phénomène.

Lors d'altérations des tendons ou ligaments, un processus naturel lent de cicatrisation se met en place, qui peut être schématisé en quatre phases.

Une première phase d'inflammation (72 heures), caractérisée par la rétraction des berges tendineuses, la formation d'un hématome dans l'espace inter-fragmentaire, la coagulation et la libération de cytokines (histamine, sérotonine, prostaglandines, bradykinine) initiant la phase inflammatoire. Survient ensuite, la phase cellulaire marquée par l'augmentation du nombre de macrophages puis par une prolifération des ténocytes (différenciation de cellules issues du paratendon). Il se produit alors la synthèse d'un collagène de type III (immature) de faible tenue mécanique.

Une deuxième phase, de prolifération cellulaire (6 semaines), caractérisée par l'organisation du caillot (apparition de néovaisseaux, dégradation macrophagique et réhabitation par des fibroblastes), par l'augmentation du nombre de ténocytes synthétisant du collagène de type I (mature) s'orientant selon les forces de contrainte et par l'augmentation de la quantité de protéoglycanes. La qualité mécanique devient satisfaisante à J45.

Une troisième et une quatrième phases de remodelage et maturation de la zone cicatricielle, caractérisées par la diminution progressive de la densité cellulaire du tendon, par l'augmentation de la densité en collagène de type I correctement orienté, par la diminution du volume cicatriciel et par l'augmentation de la résistance mécanique.

Le retour vers une structure proche de la normale demande un délai d'environ un an. Ce mécanisme de cicatrisation est donc très lent, souvent perturbé par les mouvements des tendons et/ou ligaments, et conduit souvent à des structures fragilisées, car ayant une composition fibreuse et cellulaire différente du tissu d'origine.

Dans le cas particulier de la cicatrisation après réalisation d'une autogreffe, on observe dans un premier temps, la disparition des fibroblastes du transplant et la

résorption macrophagique du transplant, conduisant à une fragilisation de celui-ci. Puis apparaît une phase d'hypervascularisation avec des néovaisseaux suivie de la réapparition des ténocytes. Enfin, une phase de remodelage caractérisée par la synthèse de matrice extracellulaire et de collagène de type I permet une augmentation de la qualité mécanique. Le néotendon prend finalement une structure proche de l'ancien tendon sous l'effet des contraintes mécaniques. Cette transformation, constituant la phase de ligamentisation, s'étend sur une période de 2 ans environ (2).

Les approches thérapeutiques actuelles pour le traitement des altérations du tendon, qu'elles soient d'origine traumatique ou liées au vieillissement, sont :

- la cicatrisation dirigée du tendon, favorisée par une baisse de l'activité voire une immobilisation,
- la réparation du tendon par suture directe, parfois aidée d'un renfort synthétique (biomatériaux résorbables ou non),
- le remplacement du tendon par une greffe de tissu biologique (autologue ou allogénique) ou par un substitut synthétique.

Dans le premier cas, le résultat aboutit souvent à une guérison incomplète comportant une séquelle fibreuse. Dans les deux derniers cas, il existe de multiples problèmes de compatibilité biomécanique compromettant les résultats sur le long terme (3,4). Par ailleurs, la pauvreté cellulaire et l'insuffisance de vascularisation limitent la régénération tendineuse.

La présente invention propose à présent de nouvelles approches thérapeutiques pour restaurer des défauts du tendon ou d'autres tissus biologiques comprenant des ténocytes ou de type fibreux ou conjonctif. La présente invention repose notamment sur la mise au point de compositions et méthodes permettant d'augmenter la composante cellulaire du tendon et/ou sa vascularisation. La présente invention repose en particulier sur l'implantation de ténocytes in vivo ou sur des compositions permettant d'augmenter le nombre de ténocytes présents dans le tissu biologique in vivo, de manière à recoloniser et reconstituer la structure défectueuse.

La présente invention repose, d'une manière générale, sur l'utilisation de ténocytes pour des applications thérapeutiques, de reconstitution de tissu,

notamment chez l'homme. L'invention repose notamment sur l'utilisation de  
ténocytes humains, en particulier autologues, multipliés in vitro, comme  
médicament susceptible d'agir pour la reconstitution de tissus biologiques,  
notamment de tissus biologiques fibreux ou conjonctif. Dans une application  
5 préférée, les ténocytes selon l'invention sont utilisés pour reconstituer des  
tendons ou ligaments présentant des défauts, comme par exemple les  
tendinites, déchirement, entorses, etc. Cette application est particulièrement  
avantageuse car permet, au contraire des processus de traitement actuels, de  
régénérer des tissus ayant les propriétés mécaniques et physiologiques proches  
10 des, voire similaires aux tissus naturels.

La présente invention décrit également des méthodes permettant de produire et  
de multiplier in vitro des ténocytes, à partir de prélèvements de tissus  
biologiques, notamment de prélèvements de fragments de tendons ou ligaments  
sains.

15 La présente invention montre en outre qu'il est possible d'implanter in vivo des  
ténocytes cultivés in vitro, le cas échéant après modification génétique de ceux-  
ci, et que ces ténocytes implantés sont viables, fonctionnels, et capables  
d'exprimer un produit recombinant. A cet égard, de manière générale, l'invention  
concerne toute méthode thérapeutique comprenant l'implantation dans un  
20 tendon ou un ligament de cellules modifiées génétiquement, par exemple de  
ténocytes ou de fibroblastes.

L'invention montre encore qu'il est possible de transférer in vivo des acides  
nucléiques recombinants dans des ténocytes pour leur faire exprimer des  
produits biologiques d'intérêt. La présente invention décrit donc, de manière  
25 générale, des approches thérapeutiques pour la reconstitution de tendons,  
ligaments ou autres tissus fibreux, basées sur l'implantation de ténocytes ou sur  
la modification in situ de ténocytes, notamment chez l'homme.

La présente invention sera décrite plus en détails dans la suite du texte. Pour  
une meilleure compréhension de la présente invention, les définitions suivantes  
30 sont fournies :

Ténocyte : Au sens de la présente invention, le terme « ténocyte » désigne les  
cellules de la composante cellulaire des tendons, ligaments ou aponévroses, par

exemple, ou d'autres tissus de type fibreux. Bien que les ténocytes des tendons, ligaments ou aponévroses puissent présenter des caractéristiques physiologiques propres, il s'agit de cellules fusiformes à noyau fin, d'origine fibroblastique. En outre, ces cellules sont capables de produire le collagène, l'élastine et la matrice extra-cellulaire. Le terme ténocyte désigne, au sens de l'invention, aussi bien des cultures primaires que des cultures secondaires (obtenues par multiplication in vitro) ou des lignées établies.

Fibroblaste : Cellule fusiforme du tissu conjonctif, capable de synthétiser les protéines de la matrice extracellulaire.

Acide nucléique recombinant : Le terme acide nucléique recombinant désigne tout acide nucléique codant un produit d'intérêt, qu'il s'agisse d'un ARN, ou d'un polypeptide (ce terme désignant généralement toute protéine, fragment de protéine ou peptide). Il s'agit plus préférentiellement d'un polypeptide ayant une activité biologique, notamment d'un facteur de croissance. L'acide nucléique recombinant peut être un ADNc, un ADNg, un ADN synthétique ou semi-synthétique, un oligonucléotide, un ARN, etc. Il peut s'agir d'un acide nucléique d'origine humaine, végétale, virale, procaryote, artificielle, etc. L'acide nucléique recombinant peut par ailleurs comprendre des séquences régulatrices de la transcription, telles que promoteurs, terminateurs, enhanceurs, séquence de sécrétion, etc. En outre, l'acide nucléique recombinant peut être sous forme linéaire, circulaire, simple-brin ou double-brin. Il peut faire partie d'un plasmide, cosmide, phage, chromosome artificiel, virus, etc.

ADN nu : Une composition comprenant un acide nucléique recombinant, dépourvue d'agent facilitant la transfection, y compris de virus. Il s'agit typiquement d'un fragment d'acide nucléique ou d'un plasmide, en solution saline et/ou glucosée (par exemple à 5% glucose).

Cellule Modifiée génétiquement : Toute cellule contenant un acide nucléique recombinant tel que défini ci-avant. Il peut s'agir d'une cellule dans laquelle cet ADN recombinant a été introduit, ou d'un descendant d'une telle cellule.

Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans une composition comprenant des ténocytes humains, autologues et/ou allogéniques. Il s'agit avantageusement d'une composition comprenant essentiellement des

ténocytes humains, c'est-à-dire de préférence dont plus de 60% des cellules sont des ténoocytes humains. Typiquement, dans une composition de ténoocytes selon l'invention, au moins 80% des cellules sont de type ténoocytes. La composition peut comprendre en outre d'autres types de cellules (fibroblastes, cellules endothéliales, etc), ou d'autres facteurs biologiques. Les compositions peuvent être en solution, ou congelées, comme il sera expliqué dans la suite du texte. Lorsque qu'il s'agit de solutions (ou suspensions), les compositions peuvent comprendre un milieu de culture, un milieu de conservation et/ou d'injection. Par ailleurs, les compositions cellulaires selon l'invention peuvent être comprises dans tout dispositif (ou conteneur) approprié, par exemple une ampoule, seringue, fiole, poche, boîte, etc.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans une composition comprenant des ténoocytes équins autologues et/ou allogéniques. Comme il sera expliqué dans la suite du texte, de telles compositions sont particulièrement avantageuses pour le traitement des affections des tendons et/ou ligaments des chevaux.

Un autre objet de l'invention réside dans une culture in vitro ou ex vivo de ténoocytes humains ou équins, notamment de ténoocytes humains autologues et/ou allogéniques. Il peut s'agir de ténoocytes primaires ou multipliés in vitro ou ex vivo, le cas échéant obtenus à partir de banques établies au préalable. Les cultures comprennent avantageusement un milieu adapté à la culture ou la multiplication des cellules.

L'invention réside aussi dans une méthode de préparation de ténoocytes, notamment humains, comprenant le prélèvement d'un fragment de tissu biologique comprenant des ténoocytes, le traitement de ce fragment pour dissocier les ténoocytes, et la mise en culture des ténoocytes.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre, le fragment de tissu biologique provient d'un tissu sain. Plus préférentiellement, il s'agit d'un petit fragment de tissu, par exemple d'un poids inférieur ou égal à 10g, préférentiellement inférieur ou égal à 1g, plus généralement compris entre 0,5 g et 5 g. La présente invention montre en effet qu'il est possible, à partir d'échantillons de taille restreinte, comportant un nombre faible de cellules ténoocytes, d'isoler ces cellules et de les expandre in vitro.



Compte tenu de la faible cellularité du tendon et de la nécessité de prélever un explant le plus petit possible, dans l'optique d'une application à une situation de manque de substance d'un tendon lésé, la présente invention décrit la possibilité et les conditions d'obtention de ténocytes à partir de petits explants tendineux.

5 L'extraction de ténocytes à partir d'un fragment de tendon de 150mg (tendon rotulien de lapin) a permis l'obtention d'une quantité de ténocytes de l'ordre de  $10^6$  éléments dans un délai de 21 jours. La croissance est ensuite exponentielle avec un temps de doublement semblant diminuer avec le nombre de passages.

10 A cet égard, l'invention montre également qu'une multiplication (expansion) importante des ténocytes en culture peut être obtenue en plusieurs passages successifs, lorsque les cellules sontensemencées à environ 25% de la confluence. Cette caractéristique constitue un mode préféré du procédé de préparation de la présente invention. La digestion d'un tendon rotulien pesant 0,5g a permis l'obtention, en 24 heures, de  $7 \cdot 10^5$  cellules. Par extrapolation, ces  
15 expériences indiquent que à partir de 1g de tendon humain environ, il est possible de produire  $10^7$  à  $10^8$  cellules après 2 semaines de culture environ.

L'expérience montre aussi que les ténocytes multipliés in vitro conservent leur capacité à reconstituer du tendon, quand ils sont réimplantés in vivo.

20 Le prélèvement de l'échantillon de tissu peut être réalisé selon différentes techniques, comme par exemple la microdissection, la microlacération, au cours d'un peignage, la ponction intratendineuse ou intraligamentaire, le prélèvement d'un fragment d'aponévrose, etc. Le fragment de tissu biologique peut également être obtenu par exemple à partir d'une banque.

25 Préférentiellement, le fragment de tissu biologique est un fragment de tendon, de ligament ou d'aponévrose. L'invention concerne donc des compositions de ténocytes obtenus (et/ou dérivés) à partir de tendon, de ligament ou d'aponévrose. Le fragment (contenant les ténocytes) peut être prélevé par des techniques chirurgicales ou microchirurgicales. A cet égard, il est également possible d'établir des banques de ténocytes, par exemple à partir de tout tissu  
30 tendineux ou ligamenteux prélevé chez un sujet (humain ou animal). Ces banques peuvent être conservées et éventuellement traitées pour permettre leur utilisation. Ces banques permettent de produire, à tout moment, des quantités importantes de ténocytes, par exemple autologues, et de disposer de telles cellules de manière rapide, sans qu'il soit nécessaire de procéder à des

prélèvements, dissociation et/ou cultures lorsqu'une intervention doit être effectuée. L'invention concerne donc également un procédé de préparation de banques de ténocytes, comprenant l'obtention de ténocytes à partir de tissu biologique, leur multiplication in vitro, et leur conservation, le cas échéant après  
5 vérification des caractères de stérilité, absence de contamination, pureté, etc. Il peut s'agir de banques de ténocytes humains ou animaux, notamment équin. Ces banques peuvent être réalisées avantageusement de manière préventive pour des sujets présentant des risques de développer des lésions des ligaments, tendons ou muscles, comme par exemple les sportifs. Ces banques peuvent être  
10 conservées sous forme congelée, dans les conditions décrites ci-après.

De préférence, les ténocytes humains selon l'invention sont préparés à partir du tendon d'Achille ou des tendons suivants :

- tendons de la patte d'oie : Muscles droit interne (M.Gracilis) et demi-tendineux (M.Semitendinosus). Ces tendons sont quasiment inutilisés par  
15 l'être humain et peuvent être prélevés intégralement. Ils peuvent ainsi permettre l'obtention par culture in vitro selon l'invention de  $10^6$  à  $10^7$  cellules environ.
- tendon du muscle petit palmaire (M. Palmaris Longus). Ce tendon peut également être prélevé intégralement. Il est possible d'obtenir ainsi un  
20 volume de tissu de l'ordre de 1 à 3 g environ.
- tendon du muscle plantaire grêle (M. Plantaris). Ce tendon peut également être prélevé intégralement. Il est possible d'obtenir ainsi un volume de tissu de l'ordre de 2 à 4 g environ.
- tendon du muscle péronier antérieur (M. Peronus Tertius). Ce tendon peut  
25 également être prélevé intégralement. Il est possible d'obtenir ainsi un volume de tissu de l'ordre de 2 à 3 g environ.
- Tendron quadricipital A partir de ce tendon, il est possible de prélever un fragment de tissu d'un volume de l'ordre de 1g, sans affecter son fonctionnement ou risque de fragilisation.
- tendon rotulien (Lig. Patellae) : A partir de ce tendon, il est possible de  
30 prélever un fragment de tissu d'un volume de l'ordre de 1g, sans affecter son fonctionnement ou risque de fragilisation.

Les ténocytes peuvent également provenir des ligaments suivants :

- Ligament acromio-coracoïdien (Lig. Coraco-acromiale)
- Ligament latéral interne du genou (Lig. Collaterale Tibiale)

ou être prélevés à partir d'aponévroses telles que :

- aponévrose fémorale (Fascia lata)
- aponévroses des muscles jumeaux (M. Gastrocnemii).

Préférentiellement, les ténocytes humains selon l'invention sont obtenus (ou dérivés) à partir de tendon. Les ténocytes ainsi préparés devraient en effet présenter des caractéristiques mécaniques et physiologiques intéressantes.

Préférentiellement, le fragment de tissu est traité par :

- découpage mécanique, et/ou
- digestion enzymatique, par exemple en présence d'enzyme(s) capable(s) d'hydrolyser les molécules de collagène.

Le découpage mécanique permet de faciliter et/ou d'accélérer la dissociation des cellules présentes dans le fragment. Ce traitement mécanique peut être réalisé par exemple au moyen de ciseaux, pinces, scalpels, bistouris, tamisage sur grilles, etc. Préférentiellement, le traitement mécanique est réalisé jusqu'à obtention d'une préparation tissulaire composée de fragments de taille inférieure à environ 20 mm<sup>3</sup>, de préférence inférieure à 10 mm<sup>3</sup>.

L'échantillon biologique est ensuite soumis à un traitement en présence d'une composition comprenant au moins une enzyme capable d'hydrolyser le collagène, de préférence le collagène de type I ou, plus généralement, capable de dégrader un ou plusieurs constituants de la matrice extracellulaire tendineuse (composée principalement de collagène de type I, associé à des protéoglycans).

Une enzyme préférée pour cette étape est la collagénase. La collagénase utilisée est préférentiellement d'origine bactérienne, comme par exemple la collagénase D, la collagénase A, la collagénase P, la collagénase de *Vibrio alginolyticus* (EP430635) ou encore la collagénase ColH de *Clostridium histolyticus* (J. Bact. 181 (1999) 2816). D'autres collagénases peuvent également être utilisées, comme des collagénases d'origine eucaryote,

notamment mammifère, par exemple humaine. En particulier, on peut utiliser des collagénases (recombinantes) de mammifère, spécifiques du collagène de type I et/ou du tendon ou également des collagénases modifiées, par exemple par mutagénèse dirigée, possédant des propriétés améliorées en terme d'efficacité, de sélectivité, de conditions d'activité, etc. En particulier, il peut s'agir de collagénases modifiées (par exemple par mutagénèse dirigée), capables d'exercer une activité à des températures basses, notamment inférieures à 20°C, plus préférentiellement inférieures à 10°C.

Dans un mode particulier, il s'agit d'une collagénase recombinante, c'est-à-dire produite par expression dans un hôte cellulaire. L'emploi d'une collagénase recombinante offre des avantages par rapports aux collagénases naturelles (absence de contaminants, efficacité, etc.).

L'étape de dissociation est généralement réalisée à une température proche de la température du corps humain, par exemple entre 32 et 40°C, de préférence proche de 37°C, pendant une période pouvant être adaptée par l'homme du métier en fonction de la quantité d'enzyme utilisée (de 0,05 à 5 mg/ml, plus préférentiellement de 0,1 à 1 mg/ml environ). Une étape typique de dissociation selon l'invention comprend la mise en contact de l'échantillon biologique (le cas échéant traité mécaniquement comme décrit ci avant), avec la collagénase (0,5 mg/ml) pendant environ 15 heures à 37°C, sous agitation. Pour l'étape de dissociation, la collagénase peut par ailleurs être utilisée en combinaison avec d'autres enzymes, recombinantes ou d'extraction, dont la qualité aura été contrôlée.

L'invention concerne plus précisément un procédé de production de ténocytes comprenant :

- le prélèvement d'un fragment de tissu biologique comprenant des ténocytes, de préférence d'origine humaine,
- le traitement de ce fragment pour dissocier les ténocytes, en présence d'une collagénase, et
- la mise en culture des ténocytes, et leur multiplication in vitro par passages successifs, de préférence par ensemencement à une densité correspondant au quart de la confluence environ.

Les ténocytes obtenus peuvent être conservés dans différents milieux de culture (Ham, RPMI, DMEM, etc.) et/ou de conservation (solutions salines, etc.) en vue de leur utilisation extemporanée ou de leur stockage, par exemple sous forme de banques de ténocytes, comme indiqué ci-avant.

- 5 Dans ce contexte, la présente invention décrit également des compositions et méthodes particulièrement efficaces pour conserver les ténocytes, en particulier sous forme congelée. Ces méthodes permettent avantageusement de conserver les ténocytes sur de longues périodes, sans affecter leurs propriétés fonctionnelles. En outre, des compositions et méthodes particulières utilisées  
10 sont compatibles avec un usage thérapeutique, et permettent donc de préserver les ténocytes ou les compositions de ténocytes destinées à être implantées in vivo.

La congélation peut être réalisée dans différentes conditions, et en présence de différents agents ou compositions protecteurs.

- 15 Selon une première variante de réalisation, la congélation est réalisée en présence de diméthyl sulfoxyde (« DMSO »). Le DMSO est un agent protecteur bien connu, qui s'insère dans les membranes cellulaires et permet de les stabiliser, ce qui empêche la destruction des cellules. Un milieu de congélation typique au DMSO comprend par exemple de 5 à 25 % de DMSO et du sérum de  
20 veau foetal. Ce type de milieu est illustré dans les exemple et permet une conservation efficace des ténocytes, sans perte d'activité.

- La congélation peut également être réalisée en absence de DMSO, notamment dans un milieu comprenant de la sérum albumine (humaine), une solution saline, et une gélatine modifiée. Un telle composition a été décrite dans la demande FR  
25 2,746,109. Dans un autre mode préféré de mise en œuvre, la congélation est réalisée dans un milieu comprenant de l'albumine (humaine), un polysaccharide, et éventuellement une solution saline.

- Un objet particulier de l'invention réside donc dans une composition comprenant des ténocytes, notamment des ténocytes humains, sous forme congelée.  
30 L'invention concerne également des milieux pour la conservation de ténocytes, notamment de ténocytes humains, comprenant des ténocytes, notamment humains et :

- du DMSO, ou

- une gélatine modifiée, ou
- un polysaccharide, ou
- du glycérol.

L'homme du métier peut par ailleurs utiliser le procédé mentionné ci-après pour adapter la composition des milieux de congélation, notamment identifier d'autres composés utilisables pour la conservation des ténocytes sous forme congelée.

Il s'agit de préférence d'un milieu comprenant des ténocytes, une solution saline, de l'albumine humaine et une gélatine modifiée ou un polysaccharide, de préférence un polysaccharide. Encore plus préférentiellement, de telles compositions selon l'invention comprennent au moins environ  $5.10^5$  ténocytes/ml.

Le milieu de conservation de l'invention est généralement préparé en mélangeant les différents constituants entre eux, puis en ajoutant ledit milieu aux ténocytes. Comme indiqué ci-avant, les ténocytes peuvent être des ténocytes primaires, fraîchement isolés à partir d'un échantillon biologique, ou bien des ténocytes multipliés in vitro (par exemple par cultures monocouches).

Pour la congélation des ténocytes, la solution saline utilisée peut être plus particulièrement une solution isotonique avec le plasma. Les sels entrant dans la composition de cette solution peuvent varier. Avantageusement elle comprend des chlorures, tels que du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du chlorure de calcium et/ou du chlorure de magnésium, et des lactates, tels que par exemple du lactate de sodium. Dans un exemple typique, la solution saline isotonique comprend du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du chlorure de magnésium et du lactate de sodium. Selon une autre variante, le chlorure de magnésium est remplacé par du chlorure de calcium. Dans ce cas les concentrations en sels de la solution saline sont équivalentes ou quasi équivalentes à celles d'une solution « Ringer-lactate ». Une telle solution est habituellement utilisée en perfusion pour compenser une déshydratation ou une perte de liquide physiologique par exemple.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la solution saline est composée essentiellement de NaCl MgCl<sub>2</sub>, KCl et lactate dans des gammes de concentrations comprises respectivement entre 2 et 9 g/l ; 0,05 et 0,2 g/l ; 0,05 et 0,5 g/l et 0,5 à 5 g/l.

Les dérivés de gélatine utilisés pour la conservation des ténocytes sont plus particulièrement des gélatines fluides modifiées. De telles gélatines fluides modifiées selon l'invention sont typiquement constituées de produits d'hydrolyse du collagène modifiés chimiquement, compatibles avec une utilisation pharmaceutique. Il s'agit préférentiellement de produits ayant un poids moléculaire moyen compris entre 10 kD et 100 kD, et encore plus préférentiellement entre 15 kD et 40 kD. Ils sont préférentiellement modifiés par réaction avec un anhydride, de manière à obtenir un produit final ayant une fluidité adaptée a l'usage recherché, selon les enseignements par exemple du brevet FR 1,291,502. Il s'agit préférentiellement de l'anhydride succinique, citraconique, itaconique, aconitique ou maléique. Une gélatine fluide modifiée particulièrement avantageuse est constituée du produit d'hydrolyse du collagène ayant un poids moléculaire moyen compris entre 15 kD et 40 kD, modifié par réaction avec l'anhydride succinique. Les gélatines fluides modifiées selon l'invention peuvent être préparées par les techniques de l'homme de l'art. Parmi les gélatines fluides modifiées, on peut citer à titre d'exemple l'oxypolygélatine, obtenue par polymérisation de la gélatine avec le glyoxal et oxydation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'autres gélatines fluides modifiées sont obtenues par réaction de la gélatine (ayant de préférence une gamme de poids moléculaire d'environ 15.000 à 36.000) avec l'anhydride succinique, citraconique, itaconique, aconitique ou maléique ou le chlorure de succinyle ou de fumaryle, comme décrit dans le brevet français n° FR1,291,502. Tous ces dérivés de gélatine sont compatibles avec une utilisation pharmaceutique et peuvent être introduits dans le courant sanguin directement en solution saline isotonique. Des gélatines fluides modifiées ont également été décrites dans les brevets US2,525,753, US2,827,419, US3,108,995.

La sérum albumine utilisée est une sérum albumine humaine (SAH), d'extraction ou recombinante. La SAH naturelle d'extraction peut être produite par purification à partir de matériel biologique d'origine humaine, par les techniques classiques de fractionnement du plasma provenant de dons de sang (Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 459 pp), ou par extraction à partir du placenta humain, selon la technique décrite par J. Liataud et al. (13ème Congrès International d'ABS, Budapest; A: "Purification of proteins. Development of biological standard", Karger (ed.), Bale, 27 (1973) 107 pp). De préférence l'albumine purifiée utilisée dans le cadre de la présente invention est une

albumine plasmatique. Tout particulièrement on peut utiliser une solution d'albumine plasmatique commerciale. La SAH recombinante peut être fabriquée dans différents types d'hôtes cellulaires, de préférence eucaryote (Cf FR 2,746,109).

- 5 Dans les milieux de conservation, le polysaccharide utilisé peut être de structure et de poids moléculaire variable. Préférentiellement, il s'agit d'un polysaccharide sulfaté, ayant de préférence un poids moléculaire compris entre 5000 et 500 000 dalton, plus préférentiellement entre 30 000 et 250 000 daltons. Le polysaccharide peut être choisi par exemple parmi le dextran (40 000 ou 60 000 daltons), l'amidon, l'hydroxyéthylamidon (240 000 dalton), etc.

Dans un mode particulier de mise en œuvre, le milieu de l'invention est composé de plasmion (FR 2,042,381) auquel de la sérum albumine humaine est ajoutée, à des concentrations variables.

- 15 Dans un autre mode, préféré, de mise en œuvre, le milieu de l'invention est composé de Rhéomacrodex<sup>R</sup>, Hémodex<sup>R</sup>, Plasmaclair<sup>R</sup> ou Hestéril<sup>R</sup>, auquel de la sérum albumine humaine est ajoutée, à des concentrations variables (de 5 à 45% pour une solution d'albumine à 20%).

Si nécessaire, les concentrations respectives des différents constituants peuvent être ajustées en utilisant la méthodologie suivante :

- 20 Sur des plaques multi-puits, sont répartis, dans chaque puits, chacun des constituants du milieu à une concentration fixe, à l'exception d'un constituant dont on fait varier la concentration. Le cas échéant, plusieurs plaques sont préparées, permettant de tester simultanément des conditions de concentrations différentes pour chacun des constituants, ou, si le nombre de puits est suffisant, ces différentes conditions sont testées sur une même plaque. Préférentiellement, chaque condition est testée au moins en double, de préférence en triple sur la plaque. Une préparation de ténocytes est alors introduite dans chaque puits, à une concentration de l'ordre de  $10^6$  cellules /ml. La plaque est placée dans l'azote liquide à  $-80^{\circ}\text{C}$  (éventuellement après une étape intermédiaire au
- 25
- 30 congélateur). Les plaques congelées sont ensuite décongelées, et la viabilité cellulaire est déterminée dans chaque puits, par exemple par coloration au bleu trypan. Chaque plaque peut être lue au moyen d'un système robotisé, de manière à permettre de traiter de nombreuses conditions et d'analyser aisément les résultats obtenus.



Les compositions de ténocytes selon l'invention peuvent être conservées sous forme congelée, par exemple à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sans affecter significativement les propriétés fonctionnelles des cellules. Comme indiqué dans les exemples, une viabilité cellulaire supérieure à 85% peut être obtenue.

5

La présente invention montre par ailleurs que les ténocytes peuvent être modifiés génétiquement, in vitro, ex vivo ou in vivo, pour contenir un acide nucléique recombinant. Cet aspect de la présente invention permet ainsi de conférer aux ténocytes, in vitro, ex vivo ou in vivo, des propriétés biologiques et des fonctionnalités particulières, améliorant par exemple le pouvoir thérapeutique de ces cellules.

Un autre objet de l'invention réside donc dans un ténocyte humain modifié génétiquement, c'est-à-dire contenant un acide nucléique recombinant.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans un ténocyte équin modifié génétiquement, c'est-à-dire contenant un acide nucléique recombinant.

15

La présente invention concerne également tout ténocyte modifié génétiquement (i.e., d'origine humaine ou animale, par exemple équine), caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant codant un facteur de croissance ou un facteur inhibant la réponse inflammatoire. De tels ténocytes présentent des propriétés avantageuses de reconstitution de tissu biologique. L'acide nucléique peut avoir été introduit dans la cellule elle-même ou dans une cellule parente de celle-ci, par différentes techniques de transfert de gène (vecteur viral, non viral, ADN nu, bombardement, méthode électrique, etc).

20

A cet égard, la présente invention décrit également des méthodes particulièrement efficaces pour le transfert de gènes dans les ténocytes in vitro, ex vivo ou in vivo. Ces techniques reposent notamment sur l'emploi d'ADN nu, d'ADN complexé à un agent facilitant (par exemple un polymère cationique) ou encore d'un rétrovirus recombinant de type GALV ou pseudotypé avec une enveloppe GALV.

25

30

L'invention concerne notamment toute méthode non-virale de transfert d'un acide nucléique recombinant dans un ténocyte, humain ou animal, comprenant la mise en contact d'un ténocyte, in vitro, ex vivo ou in vivo, avec l'acide

nucléique recombinant. Ces méthodes non-virales selon l'invention comprennent par exemple :

- la mise en contact directe sous forme d'ADN nu
- la mise en contact en présence d'agent(s) facilitant la transfection, par exemple de polymères cationiques (Polyéthylèneimine), de lipides cationiques ou de peptides,
- le bombardement ou encore
- l'application d'un champs électrique.

Une méthode particulièrement préférée repose sur l'utilisation d'ADN nu. Ainsi, un objet particulier de l'invention réside dans une méthode de transfert de gènes dans un ténocyte comprenant la mise en contact d'un ténocyte, in vitro, ex vivo ou in vivo avec un acide nucléique recombinant nu.

L'invention réside encore dans l'utilisation :

- d'une composition comprenant de l'ADN nu, pour la préparation d'une composition destinée au transfert de cet ADN dans les ténocytes in vivo ;
- d'une composition comprenant un rétrovirus recombinant pseudotypé avec une enveloppe GALV, pour la préparation d'une composition destinée au transfert de cet ADN dans les ténocytes in vivo.
- d'un acide nucléique recombinant pour la préparation d'une composition destinée à la modification génétique in vivo d'un ténocyte humain.

La présente invention concerne également l'utilisation des ténocytes pour le traitement de différentes pathologies ou déficiences, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (notamment les chevaux).

Ainsi, un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation de ténocytes pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation in vivo.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de ténocytes pour la préparation d'une composition destinée à la mise en œuvre d'une méthode de traitement thérapeutique, diagnostique ou chirurgical du corps humain ou animal.

S'agissant des animaux, on cite plus particulièrement les chevaux, notamment les chevaux de course, qui sont sujets à différentes altérations des tendons ou

ligaments, de type tendinite. Ces chevaux sont soit abattus, soit traités par peignage tendineux, ce qui génère cependant des tendons plus rigides ou épais, dont les propriétés mécaniques ne sont pas bonnes. L'invention permet par des implantations de ténocytes autologues (ou allogéniques ou xénogéniques), par exemple à partir de banques préétablies, de reconstituer des tendons ayant des propriétés mécaniques similaires aux tendons non altérés.

Les ténocytes utilisés dans ces méthodes de traitement sont préférentiellement autologues, c'est-à-dire obtenus à partir du sujet auquel ils sont réimplantés.

Comme indiqué ci-avant, il s'agit généralement de ténocytes multipliés in vitro, éventuellement modifiés génétiquement, par exemple pour coder un facteur de croissance. Il peut toutefois s'agir également de ténocytes allogéniques (i.e. provenant d'un autre sujet de la même espèce) ou xénogéniques (i.e., d'une autre espèce).

L'invention décrit également des méthodes de restauration de défauts de tissus in vivo, comprenant l'administration, à un sujet, de ténocytes, de préférence autologues, par exemple multipliés in vitro. Les cellules peuvent en outre être modifiées génétiquement. L'administration peut être réalisée de différentes manières. Il s'agit préférentiellement d'une injection péri-tendineuse (dans la gaine entourant le tendon) ou intratendineuse (à l'intérieur même du tendon, par exemple entre les fibres). L'injection peut être réalisée par voie percutanée, lors d'actes de microdissection permettant par exemple de dilacérer (écarter) le tendon, notamment au cours d'un peignage.

Préférentiellement, les doses de cellules injectées sont comprises entre  $10^4$  et  $10^9$ , plus préférentiellement entre  $5 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^7$  cellules par injection. Une injection typique comprend  $10^6$  à  $10^7$  cellules. Par ailleurs, deux injections successives peuvent être réalisées (voire plus), si nécessaire. La quantité précise et le nombre d'injections peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du sujet, de la sévérité, localisation et/ou du volume du défaut à traiter, de la présence de cellules modifiées génétiquement, etc. En particulier, dans le cadre de la régénération d'un défaut musculaire (par exemple un déchirement musculaire), des quantités plus importantes de cellules peuvent être administrées.

L'utilisation de ténocytes selon l'invention est particulièrement avantageuse, en chirurgie orthopédique ou pour la réparation des lésions musculaires. En effet, les ténocytes possèdent une activité métabolique de régénération tissulaire importante, adaptée aux nécessités locales de réparation. L'emploi de cellules issues de structures anatomiques proches des structures à réparer constitue un autre avantage majeur, dans la reconstitution de tissus ayant de bonnes propriétés mécaniques. L'emploi de ténocytes selon l'invention devrait ainsi permettre de diminuer le délai de cicatrisation spontanée des structures fibreuses (tendons, ligaments, etc.) qui est souvent long (supérieur à 45 jours) et incomplet. Dans ce but, on utilise préférentiellement, pour la réparation de lésions des tendons, des compositions de ténocytes provenant (ou dérivés) de tendons, et pour la réparation de lésions des ligaments, des compositions de ténocytes provenant (ou dérivés) de ligaments. L'utilisation des ténocytes, multipliés in vitro, permet non seulement d'augmenter la composante cellulaire du tissu lésé, mais également de servir de vecteur pour l'expression d'acides nucléiques recombinants. A cet égard, un autre avantage de l'invention réside dans l'absence de migration, hors de la structure anatomique traitée, des ténocytes. Ceci permet notamment un effet localisé, en particulier lors du transfert de gènes ex vivo ou in vivo. En outre, le fait que la délivrance du produit biologique recombinant s'effectue au contact même de la cellule effectrice favorise l'intensité de la réponse. Enfin, le chemotactisme existant lors de processus cicatriciels favorise également l'attraction des ténocytes transduits et/ou injectés au sein de la zone lésionnelle, augmentant encore l'effet local.

Une autre application des techniques d'expansion cellulaire in vitro selon l'invention concerne la réparation de lésions musculaires traumatiques. Ainsi, dans les ruptures plus ou moins étendues, le traitement conservateur est la règle, mais au prix d'une cicatrisation lente. En outre, on observe parfois la persistance d'une encoche musculaire accompagnée d'une perte de puissance musculaire et d'un risque de comblement de la zone rompue par un tissu cicatriciel fibreux diminuant les qualités mécaniques du muscle réparé. L'injection (par exemple percutanée) d'une composition contenant des ténocytes (ou des myoblastes) selon l'invention permet un comblement rapide de la zone rompue, tout en conservant les qualités mécaniques du muscle.

L'invention concerne donc également des compositions et méthodes pour :

- reconstituer la composante cellulaire de tendons, ligaments ou muscles,
- faciliter la cicatrisation des ligaments, tendons ou muscles,
- traiter des défauts de tissus biologiques, comme par exemple des défauts de tendons, ligaments, muscles squelettiques, etc, ou encore
- 5     - produire in vivo des facteurs biologiques, par administration de ténocytes modifiés génétiquement ex vivo ou par modification génétique des ténocytes in vivo.

Dans un mode particulier de l'invention, l'acide nucléique recombinant code un facteur de croissance et l'invention permet de produire in vivo un facteur de croissance de la composante cellulaire du tendon ou bien de sa vascularisation, dans le but d'améliorer la régénération tendineuse ou ligamentaire ou, plus généralement de tissus biologiques conjonctif et/ou fibreux ou musculaire, tels le muscle squelettique par exemple), et/ou de produire un ou plusieurs facteurs réduisant les réponses inflammatoires.

15     On entend par facteur de croissance toute protéine, polypeptide ou peptide susceptible de provoquer des réponses biologiques spécifiques comme, la chimotaxie, la prolifération cellulaire, la synthèse des fibres collagène et des protéines de la matrice, l'induction de la néovascularisation et la sécrétion d'autres facteurs de croissance.

20     Parmi les facteurs de croissance utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer notamment :

- Le TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), qui semble un médiateur impliqué dans la cicatrisation du tendon car sa présence est corrélée aux phénomènes de réparation du tendon (5),
- 25     - Le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), qui joue un rôle important dans la prolifération des ténocytes et dans l'angiogenèse (6). En effet, ses récepteurs sont exprimés pendant toute la période de néo-vascularisation. Le bFGF est produit par les cellules inflammatoires, mais aussi, par les ténocytes. Cette production est régulée par l'environnement cicatriciel.
- 30     - Le EGF (Epidermal Growth Factor), qui stimule la prolifération des ténocytes et dont les récepteurs sont présents pendant une grande partie du processus cicatriciel. L'expression constante de récepteurs au bFGF et le pic d'expression

pour les récepteurs à l'EGF dans la membrane synoviale, indiquent que la synoviale intervient dans la migration des ténocytes et la revascularisation d'une lésion ligamentaire. L'augmentation des récepteurs se produit également au niveau du site d'insertion du ligament, zone de vascularisation importante, permettant la migration cellulaire par un effet chimotactique.

- Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), qui exerce, sur les ténocytes, des activités mitogène et chimotactique. Il stimule également la synthèse de collagène (7).

- le VEGF (« Vascular Endothelial cell Growth Factor ») dont l'expression permet d'augmenter la vascularisation des tendons ou ligaments ou muscles, et ainsi d'aider à la reconstitution de tissus défectueux.

La période idéale d'administration de gènes codant de tels facteurs de croissance, ou de cellules contenant de tels gènes, dans un but thérapeutique, se situe préférentiellement entre le 1<sup>er</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour après la lésion, qui correspond à la période d'expression optimale des récepteurs. Il est entendu que l'administration peut être réalisée à des périodes différentes (notamment plus tardives).

Ces différents facteurs de croissance et leurs récepteurs spécifiques ont ainsi été détectés pendant les phases successives de la cicatrisation ligamentaire et tendineuse. Dans de nombreuses circonstances, la réparation tissulaire est insuffisante, soit par défaut de cicatrisation intrinsèque (ligament croisé antérieur par exemple), soit par l'existence de facteurs particuliers diminuant les aptitudes de ces tissus à cicatriser (vieillesse, prise de corticoïdes, diabète, etc.). Il a été montré, dans le ligament croisé antérieur, une présence insuffisante en médiateurs et en récepteurs spécifiques. Il est possible que cela puisse également expliquer les difficultés de réparation du tissu tendineux.

Parmi les facteurs inhibant la réaction inflammatoire utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer notamment l'interleukine-10, le récepteur de l'interleukine-1, des coricomimétiques ou, plus généralement, tout polypeptide capable d'inhiber le développement d'une réponse inflammatoire.

Par ailleurs, l'acide nucléique recombinant peut également coder d'autres produits biologiques d'intérêt, comme des produits de marquage, des produits

présentant une toxicité conditionnelle (de type thymidine kinase par exemple), des enzymes, des composés de la matrice extracellulaire, etc.

La présente invention permet à présent une libération locale, à des doses non-toxiques, de tels facteurs de croissance ou autres produits biologiques, et permet ainsi d'améliorer les propriétés mécaniques et structurelles des tendons et des ligaments en cours de cicatrisation. Ces différents produits biologiques peuvent être utilisés seuls ou en combinaisons. La présente invention montre à présent qu'il est possible d'implanter, dans les tissus fibreux d'un sujet (par exemple dans un tendon ou un ligament) des cellules modifiées génétiquement capables d'exprimer un polypeptide, et que ce polypeptide diffuse ou est au contact des cellules présentes dans le tendon (ou tissus fibreux).

Comme indiqué ci-avant, l'invention a donc pour objet l'utilisation de ténocytes pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation chez l'homme, en particulier pour traiter des défauts de tissus fibreux, tels que ligaments, tendons ou muscle squelettique, par exemple.

Le terme « traiter des défauts » désigne plus particulièrement la restauration ou la compensation de défauts, c'est à dire en particulier la reconstitution, au moins partielle, de tissu dans des zones où celui-ci est défectueux. De préférence, il s'agit d'une utilisation dans un contexte autologue, c'est-à-dire que l'échantillon biologique utilisé pour produire les ténocytes provient du sujet auquel les ténocytes produits seront administrés. Toutefois, comme indiqué ci-avant, l'utilisation de cellules allogéniques ou xénogéniques (lapin, cheval, porc, etc.) peut également être envisagée pour le traitement de pathologies humaines.

Plus généralement, l'invention concerne l'utilisation de toute cellule, autologue, allogénique ou xénogénique, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation ou d'administration dans un tendon ou ligament. Il s'agit plus particulièrement d'un ténocyte ou d'un fibroblaste, cultivé in vitro, éventuellement modifié génétiquement.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode pour restaurer des tendons, ligaments ou muscles in vivo, comprenant l'administration à un sujet (de préférence humain) d'une composition de ténocytes. Il peut s'agir de ténocytes autologues, allogéniques ou xénogéniques, de préférence multipliés in

vitro. Les ténocytes peuvent en outre être modifiés génétiquement. De préférence, on utilise des ténocytes autologues.

A cet égard, la méthode de l'invention comprend avantageusement le prélèvement d'un échantillon de tendon ou ligament sain chez un sujet, la  
5 préparation de ténocytes à partir de cet échantillon, puis l'administration, à ce sujet, d'une composition de ténocytes ainsi obtenus.

Selon une autre variante, l'invention concerne une méthode pour restaurer des tendons ou ligaments in vivo, comprenant l'administration à un sujet d'une composition de fibroblastes. Il peut s'agir de fibroblastes autologues,  
10 allogéniques ou xénogéniques, de préférence multipliés in vitro. Les fibroblastes peuvent en outre être modifiés génétiquement, de préférence pour exprimer un facteur de croissance ou tout autre acide nucléique permettant au fibroblaste d'acquérir les propriétés biologiques adaptées à un usage selon l'invention, notamment un phénotype ou des caractéristiques de ténocyte, comme par  
15 exemple un gène codant pour un facteur augmentant la production de collagène, pour une composante de la matrice extracellulaire, pour un facteur d'ancrage, etc. De préférence, on utilise des fibroblastes autologues, par exemple cutanés.

Selon cette variante, la méthode de l'invention comprend avantageusement le prélèvement d'un échantillon de fibroblastes sains chez un sujet, leur  
20 modification génétique ex vivo, puis l'administration dans un tendon ou un ligament du même sujet, d'une composition de fibroblastes ainsi obtenus.

Selon une autre variante, l'invention concerne l'utilisation de ténocytes ou fibroblastes, autologues, allogéniques ou xénogéniques, pour favoriser la cicatrisation de déchirures ou ruptures musculaires. La rupture d'un muscle  
25 s'accompagne en effet d'une rétractation des deux parties rompues (ou déchirées) vers les insertions tendineuses. L'expérience a montré, par exemple lors de ruptures du quadriceps, que la meilleure thérapeutique était d'une part d'empêcher, voire de résorber l'hématome et, d'autre part, de favoriser une cicatrisation du muscle en extension, car toutes les tentatives de sutures de ces  
30 muscles ont toujours échoué. Une application avantageuse de l'invention réside donc dans l'injection de suspensions de ténocytes ou fibroblastes au sein de la lésion afin d'accélérer le processus de cicatrisation fibreuse et donc de diminuer le temps d'immobilisation du muscle.



Dans la présente invention, lorsque des fibroblastes allogéniques ou xénogéniques sont utilisés, ils peuvent provenir d'une banque établie.

Différentes techniques d'implantation peuvent être mises en œuvre, selon le matériel implanté (suspension, matrice, etc.).

- 5 A cet égard, la présente invention décrit une méthode pour l'implantation de cellules in vivo, dans un tendon ou ligament, comprenant l'injection intratendineuse ou intraligamentaire de cellules.

Selon une autre variante, il s'agit d'une injection péri-tendineuse ou péri-ligamentaire, c'est-à-dire dans la gaine entourant le tendon ou le ligament.

- 10 Selon une autre variante, les cellules sont placées à l'intérieur d'un dispositif capable de se positionner autour d'un tendon ou d'un ligament, pour enrober la partie défectueuse de celui-ci. Il peut s'agir de tout matériel biocompatible (éventuellement biodégradable) capable de former un manchon autour d'un tendon ou d'un ligament. Les cellules sont ainsi maintenues en contact avec le  
15 tissu et la zone à traiter.

- L'invention réside également dans l'utilisation d'un film biocompatible, en particulier résorbable, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation de cellules, notamment de ténocytes sur un tendon ou un ligament défectueux. Il s'agit plus préférentiellement de ténocytes en solution liquide ou  
20 gélifiée, multipliés in vitro. Encore plus préférentiellement, il s'agit de ténocytes autologues.

- Les ténocytes, compositions et méthodes selon l'invention, sont également utilisables pour l'étude de l'expression de gènes dans les ténocytes, leur différenciation, l'identification de gènes cibles, le screening de composés  
25 capables de moduler l'activité des ténocytes ou leur prolifération, etc.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### 30 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la structure d'un tendon

Figure 2 : Vue schématique d'une section transversale d'un tendon

Figure 3 : Evolution dans le temps du nombre de ténocytes transduits par le gène LacZ, après infection rétrovirale.

Figure 4 : Evolution dans le temps du taux de ténocytes transduits par le gène LacZ, après infection rétrovirale (au neuvième passage).

- 5 Figure 5 : Evolution dans le temps du taux de ténocytes transduits par le gène LacZ, après infection rétrovirale (au 18<sup>ème</sup> passage).

Figure 6 : Quantité de bêta-galactosidase exprimée par les ténocytes transduits.

Figure 7 : Ténocytes de lapin transduits in vitro par un rétrovirus GALV-LacZ

- 10 Figure 8 : Transfection in vivo d'un tendon de souris par le plasmide CMV-LacZ (40µg) (96heures post transfert)

Figure 9 : Coloration in toto d'un tendon de souris, 48 heures après transfection in situ par le plasmide CMV-LacZ (40 µg).

Figure 10 : Résultats à 48 heures de l'implantation dans un tendon rotulien de lapin de ténocytes modifiés ex vivo par le plasmide CMV-LacZ.

- 15 Figure 11 : Résultats à 48 heures de l'implantation dans un tendon rotulien de lapin de ténocytes modifiés ex vivo par le plasmide CMV-LacZ.

- 20 Figure 12 : Courbes de croissance représentant les premier, second et troisième passages (P1, P2, P3) de cultures primaires de ténocytes préparées par dissection et digestion à la collagénase de fragments de tendon d'Achille humain issu d'un sujet de 28 ans. (12a) cultures directes ; (12b) cultures après congélation/décongélation des cellules.

Figure 13 : Image en microscopie de ténocytes humains transduits par des rétrovirus codant la protéine LacZ, après coloration au X-gal.

## 25 **MATERIEL & METHODES**

### **1. Vecteurs**

Les vecteurs utilisés *in vitro* ont été des plasmides et des vecteurs rétroviraux.

## 1.1. Plasmides

### Plasmide avec gène codant pour la $\beta$ -galactosidase

Le plasmide utilisé était le plasmide CMV-LacZ, un ADN plasmidique modifié  
5 d'Escherichia Coli (pCMV $\beta$ , produit par Clontech®). Ce plasmide possède un  
promoteur CMV, issu du cytomégalo virus humain, permettant l'expression forte  
du gène LacZ, originaire de l'Escherichia Coli, codant pour la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -  
Gal). La séquence est terminée par un signal de polyadénylation (poly A)  
provenant du virus SV 40 (simian virus). Le plasmide contient par ailleurs une  
10 origine de réplication provenant d'E.Coli (Col E1 Ori) et un gène de sélection  
permettant la résistance à l'ampicilline (figure 3).

Les étapes de production du plasmide CMV-LacZ comprenaient (8):

- culture sur milieu de sélection des bactéries renfermant le plasmide,
- extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline,
- 15 - récupération du culot bactérien,
- élimination de l'ADN génomique bactérien,
- précipitation de l'ADN plasmidique,
- purification par double gradient de chlorure de césium (précipitation des  
protéines, ultracentrifugation 2 fois 6 heures à 55000 rpm à 20°C, puis dialyses),
- 20 - précipitation de l'ADN plasmidique (concentration de l'ADN).

### Plasmides avec gène codant pour la green fluorescent protein

D'autres structures plasmidiques codant pour un gène marqueur de type GFP  
(green fluorescent protein) ont été utilisées. Ce type de gène permet une  
détection par fluorescence sous l'action de rayons ultra-violet. Les plasmides  
25 utilisés étaient le SV40-GFP (promoteur du Simian Virus 40) et le PET 47. La  
méthode de production était identique à celle décrite précédemment.

## 1.2. Vecteurs rétroviraux

Deux types de vecteurs rétroviraux transduisant le gène nls-LacZ ont été utilisés.  
Ce gène permet le marquage, en bleu, du noyau des cellules transduites après  
30 coloration par le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-b-galactopyranoside). Les  
vecteurs rétroviraux produits dérivait, pour les uns, du virus de la leucémie  
murine de Moloney (Mo-Mulv) et, pour les autres, du virus de la leucémie aiguë

du Gibbon (Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) (9). Les lignées d'encapsidation étaient, dans le 1<sup>er</sup> cas, des  $\Psi$ crip LLZ ( $\Psi$ crip-LLZ-nls LacZ) et, dans le 2<sup>ème</sup> cas, des GALV 18. Ces lignées sont décrites plus loin.

Les surnageants de production des virus ont été récupérés et purifiés par un  
5 filtre de 0,45  $\mu$ m (élimination des cellules d'encapsidation et des débris cellulaires), puis la qualité des stocks a été vérifiée.

Les surnageants produits ont été répartis, dans des tubes stériles étanches, sous forme d'aliquots afin d'éviter des congélations successives. Les tubes étaient alors conservés à -80°C.

## 10 **2. Cultures cellulaires**

### **2.1. Ténocytes**

Des ténocytes ont été isolés à partir de tendons d'Achille de souris mâles adultes de type OF1, SPF (specific pathogen free), d'environ 40 g (IFFA-CREDO®), ou de tendons rotuliens de lapins mâles de type New Zealand, SPF  
15 (specific pathogen free), d'environ 2,5 Kg (ESD® -France). Les ténocytes humains sont obtenus dans des conditions similaires.

### **2.2. Lignées d'encapsidation**

Deux types de lignée d'encapsidation ont été utilisés pour la production des vecteurs rétroviraux :

20 La lignée GALV 18, produite par F.L. Cosset, qui produit des rétrovirus recombinants dont l'enveloppe est celle du virus GALV responsable de la leucémie aiguë du Gibbon. Ces cellules d'expression dérivent de cellules d'ostéosarcome de type TE 671 qui ont été transfectées par des vecteurs apportant les gènes gag-pol, d'une part, et env, d'autre part, pour aboutir, après  
25 sélection, aux cellules TE FLY GA délivrant des particules virales vides. Après transfection par un vecteur contenant le gène nls-LacZ, les cellules d'encapsidation GALV 18 ont été obtenues.

Les cellules d'encapsidation de type  $\Psi$ cripLLZ ( $\Psi$ crip-LLZ-nls LacZ) sont des fibroblastes de souris producteurs de particules virales recombinantes  
30 amphotropes, dont l'enveloppe est celle du virus de la leucémie murine de Moloney.

### **2.3. Milieux de culture cellulaire**

### Milieu de base :

Deux types ont été utilisés, le DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, référence 41966, Life Technologies®) et le HAM F12 (milieu de Ham, référence 21765, Life Technologies®) (10,11).

### 5 Supplémentation :

Elle nécessitait:

- du sérum de veau fœtal (FCS, fetal calf serum, laboratoire HyClone®), inactivé par la chaleur, à 10 p.100 du volume ou du sérum de veau nouveau-né (NN, laboratoire HyClone®),

10 - de la L-Glutamine à 4 mM/l (Gibco®),

- un mélange d'antibiotiques PSN (pénicilline, streptomycine, néomycine) à 1X (stock 100X, référence 15640-022, Life Technologies®),

- de la vitamine C (acide ascorbique ) à 50 mg/l (Sigma®, réf : 44-03) dans certains cas (12).

15 Les ténocytes de lapin ou humains ont été cultivés dans les deux types de milieu de façon comparative, supplémentés par du FCS, avec et sans vitamine C. Les ténocytes de souris ont été cultivés dans du DMEM supplémenté par du FCS et de la vitamine C. Lors des cultures, les cellules étaientensemencées sur des supports de culture en polystyrène (Costar®) dont la taille variait de 75 à 225  
20 cm<sup>2</sup>. Ces supports étaient ensuite placés dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>). Les milieux étaient systématiquement renouvelés tous les 2 à 3 jours. A confluence, les cellules étaient décollées en utilisant de la trypsine-EDTA (Life Technologies®). Un échantillon était alors analysé, après coloration au bleu trypan, afin de déterminer la concentration  
25 cellulaire, permettant de calculer le nombre total de cellules, et d'apprécier le taux de mortalité cellulaire. Le taux de réensemencement des cellules était un adapté au type de manipulation. Plusieurs lignées primaires de ténocytes (primocultures) ont été constituées à partir de tissus tendineux d'origine animale.

### 3. Analyse des transferts de gènes *in vivo*

#### 30 3.1. Technique de coloration sur lame

Dès le prélèvement sur les animaux, les tissus étaient plongés dans l'azote liquide puis transportés au laboratoire d'histologie. Les tissus, après inclusion dans une résine, étaient découpés au microtome, en coupes de 5 à 10 µm

d'épaisseur. Les coupes de tissu étaient alors déposées sur lames. La fixation des coupes, d'une durée de 30 min, utilisait une solution de PBS contenant 1% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après 2 rinçages au PBS, les coupes étaient laissées dans la solution de X-Gal pendant 4 heures. La lecture des coupes était améliorée par la contre-coloration de quelques coupes par l'HE (hématoxyline-éosine) soulignant les noyaux cellulaires et permettant d'identifier la présence d'une infiltration de cellules mononucléées.

### 3.2. Technique de coloration *in toto*

Cette technique permettait de détecter une activité  $\beta$ -galactosidase par la présence, dans le tissu monobloc étudié, d'une coloration bleutée visible macroscopiquement.

Après prélèvement sur les animaux, les tissus étaient lavés 2 fois dans du PBS. Pour la fixation, les prélèvements « monobloc » étaient plongés, pendant 30 min, dans une solution de PBS contenant 1% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après 2 rinçages au PBS, les tissus étaient laissés dans la solution de X-Gal durant toute la nuit (O.N.), à une température de 32°C. Après 2 rinçages au PBS, les tissus étaient inclus dans la paraffine. Des coupes, de 5 à 10  $\mu$ m d'épaisseur, centrées sur les zones bleues étaient réalisées puis déposées sur lames. La contre-coloration de quelques coupes par l'HE permettait de souligner les noyaux cellulaires.

### 3.3. Analyse macroscopique

L'examen du tendon était réalisé lors du prélèvement mais aussi après coloration de la pièce *in toto*.

Lors du prélèvement, l'aspect global du tendon et des tissus péritendineux était étudié, ainsi que l'aspect de l'articulation de voisinage (inspection du cartilage, des ménisques et de la membrane synoviale). Les signes d'inflammation, une modification de volume ou de texture du tendon, et l'existence d'adhérences étaient particulièrement recherchés.

Après coloration de la pièce *in toto*, une analyse macroscopique du prélèvement permettait la recherche d'une coloration bleutée, traduisant la présence de cellules transduites. Cette recherche était effectuée, dans et autour du tendon, en précisant la taille, la situation et la diffusion de cette coloration.

### 3.4. Analyse microscopique

Les inclusions de tissus, les coupes et les interprétations de lames ont été réalisées. Les techniques employées étaient, soit la technique de coloration sur lame (technique classique), soit la technique de coloration *in toto*.

5 L'analyse des lames s'attachait à mettre en évidence la présence d'une coloration bleue signant la présence de cellules transduites dans le tendon. Le bleu était strictement nucléaire avec le gène nls-LacZ, et, nucléaire et cytoplasmique avec le gène LacZ. La distribution des zones bleutées était notée. Par ailleurs, l'infiltration de cellules mononucléées ou un aspect d'hypervascularisation, traduisant une réaction inflammatoire, étaient recherchés  
10 autour des zones bleutées. La lecture était améliorée par la contre-coloration à l'HE. L'étude de tendons injectés, dans les mêmes conditions sans gène LacZ, permettait de vérifier l'absence d'activité  $\beta$ -Galactosidase endogène.

### **EXEMPLE 1 : PRODUCTION ET CULTURE DE TENOCYTES**

15

Cet exemple décrit la production et la culture de ténocytes obtenus à partir de fragments de tissus sains.

Après prélèvement du tendon, réalisé sur le sujet dans des conditions d'asepsie, les cellules ont été obtenues par deux étapes :

20 - le découpage mécanique du prélèvement tendineux en fragments millimétriques, à l'aide de ciseaux fins. Les fragments étaient ensuite mis en culture.

- la digestion enzymatique par la collagénase de type D à faible activité trypsine (Boehringer<sup>®</sup>, réf. 1.088.866). Une phase de digestion initiale utilisait  
25 une solution de HBSS (Solution saline équilibrée de Hanks, Life Technologies<sup>®</sup>) renfermant 1 mg/ml de collagénase (soit 112 U/ml) sous un volume équivalent à 5 ml de solution pour 0,1 g de tissu à digérer (10). Le tube était placé, dans l'incubateur à 37°C, sur un agitateur rotatif, pendant une heure. Une seconde phase de digestion utilisait une solution renfermant 0,25 mg/ml de collagénase  
30 sous un même volume. Le tube était alors placé dans l'incubateur à 37°C O.N. (over-night). Le lendemain, le contenu du tube était passé sur un filtre de 70  $\mu$ m (cell strainer<sup>®</sup>) puis mis en culture dans une flasque de 25 cm<sup>2</sup> après 2 lavages au PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco<sup>®</sup>).

Les cultures primaires étaient réalisées dans les conditions décrites plus haut. Le milieu était renouvelé toutes les 48 H, le repiquage effectué lorsque les cellules arrivaient à confluence.

5 Lors de deux manipulations distinctes réalisées sur deux lapins différents, l'apparition des premières lignées cellulaires était observée à partir du 13<sup>ème</sup> jour après la dilacération mécanique du prélèvement tendineux (1/3 du tendon rotulien, soit environ 160 mg). Lors de l'association à la digestion enzymatique par la collagénase D, dans deux autres manipulations, les premières lignées  
10 cellulaires apparaissaient vers le 4<sup>ème</sup> jour. La confluence, sur un support de 25 cm<sup>2</sup>, était obtenue aux alentours du 21<sup>ème</sup> jour après dilacération mécanique isolée et aux alentours du 16<sup>ème</sup> jour après dilacération mécanique associée à la digestion enzymatique O.N.

15 Lors de deux manipulations distinctes, la dilacération mécanique d'un tendon d'Achille de souris, associée à la digestion enzymatique par la collagénase D, a permis d'isoler le 1<sup>er</sup> jour de 5 à 10<sup>3</sup> cellules par tendon (d'environ 25 mg). La confluence, sur un support de 25 cm<sup>2</sup>, était obtenue en 12 jours et un nombre de cellules, de l'ordre de 3.10<sup>6</sup> cellules, était obtenu en 21 jours.

20

Lors de plusieurs manipulations distinctes, la dilacération mécanique de fragments de tendon d'Achille humains, associée à la digestion enzymatique par la collagénase, a permis d'isoler des ténocytes humains, et de placer et maintenir ceux-ci en culture. Les résultats présentés sur la Figure 12a montrent  
25 que les ténocytes humains, aux différents passages, présentent une capacité de prolifération (expansion) in vitro importante, permettant de générer suffisamment de cellules viables et biologiquement fonctionnelles pour des applications thérapeutiques.

30 Les ténocytes isolés à partir de tendons de lapins NZ étaient de grosses cellules fusiformes d'allure fibroblastique.



A confluence, la densité cellulaire était d'environ  $2,8 \cdot 10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$ . Cette valeur a été constatée sur différentes tailles de support de culture cellulaire (de 25 à 220  $\text{cm}^2$ ) en laissant les cultures approcher de la confluence maximale en monocouche. Au-delà de la confluence, ces cellules se développaient sur des couches superposées et cela ne permettait plus de les séparer correctement.

La taille des ténocytes a été estimée par le rapport de la valeur de la surface du support de culture sur le nombre de ténocytes à confluence. Cette taille était de l'ordre de  $3,6 \cdot 10^3 \mu^2$ . Compte tenu des observations microscopiques qui montraient que le rapport de longueur sur largeur était d'environ 4/1, la taille des ténocytes était estimée à environ 120  $\mu$  de long sur 30  $\mu$  de large. Cependant, il a été observé que la taille et la forme de ces cellules variaient selon le degré de confluence et la fréquence de repiquage.

Des essais de culture primaire utilisant des taux d'ensemencement variables (du 1/16 de confluence à 3/4 de confluence) ont montré que le développement des ténocytes semblait optimal lors de l'ensemencement au 1/4 de confluence. Cela a été évalué de façon semi-quantitative en appréciant le temps de doublement et en tenant compte de la fréquence de repiquage. En effet, les décollements devaient être réguliers avec une fréquence inférieure à 8 jours. Au-delà de ce délai, même s'ils n'étaient pas à confluence, les ténocytes nécessitaient un temps de contact prolongé avec la trypsine, le taux de mortalité cellulaire devenait important et la dissociation des ténocytes était de mauvaise qualité.

Le temps de doublement cellulaire a été estimé sur deux cultures de ténocytes, issus d'un même lapin, poursuivies au-delà de 45 jours. Les conditions de cultures étaient identiques dans les deux expériences. Les ténocytes étaient ensemencés, au 1/4 de confluence ( $7 \cdot 10^3$  cellules /  $\text{cm}^2$ ), sur un support de 150  $\text{cm}^2$ , le milieu était renouvelé tous les 2 jours et le repiquage effectué une fois par semaine.

Les ténocytes de lapin étaient au 9<sup>ème</sup> passage dans l'expérience 1 et au 18<sup>ème</sup> passage dans l'expérience 2. Le temps de doublement des ténocytes variait, de façon importante, dans une même culture dans des conditions de repiquages réguliers. La vitesse de croissance des ténocytes, par diminution du temps de doublement, tendait à augmenter avec le nombre de passages. Les résultats sont rapportés dans le tableau I.

Des ténocytes humains sont obtenus dans les mêmes conditions, à partir de tendons ou fragments de tendons humains, tels que tendons de la patte d'oie, tendon rotulien ou tendon du muscle petit palmaire.

## 5 **EXEMPLE 2 : CONGELATION DES TENOCYTES**

Des méthodes de conservation par congélation des ténocytes ont été développées afin de pouvoir facilement disposer de cellules pour les différentes expérimentations, sans avoir besoin de recourir à de nouvelles extractions.

- 10 Cet exemple montre que les ténocytes primaires ou secondaires peuvent être congelés sans altérer leur viabilité.

Les congélations ont été réalisées en présence de DMSO, dans un milieu 1/2 volume de sérum de veau nouveau-né et 1/2 volume d'un mélange de RPMI renfermant 20% de DMSO. Les tubes étaient conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis dans  
15 l'azote liquide. Des résultats positifs peuvent également être obtenus en réalisant la congélation des ténocytes en présence de milieux dépourvus de DMSO et/ou de glycérol, tels que décrits dans la description.

Toutes les expériences de congélation-décongélation (environ 30  
20 décongélation) ont montré la bonne tolérance des ténocytes à la technique de congélation utilisée. Après décongélation, le taux de mortalité était faible et les cellules retrouvaient des caractéristiques de croissance *in vitro* similaires aux cellules de passage identique et non congelées. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que les ténocytes sont des cellules à vie limitée dont le nombre de  
25 divisions est restreint (13). En définitive, dans des délais relativement courts, il est possible d'obtenir un nombre élevé de cellules que l'on peut congeler en vue d'une utilisation ultérieure. A cet égard, la Figure 12b démontre les capacités de survie et de croissance de ténocytes humains après congélation/décongélation. Cette figure montre ainsi que les ténocytes humains peuvent être congelés et  
30 décongelés, que ces cellules restent viables et cultivables, qu'elles peuvent être multipliées *in vitro* après décongélation, et restent biologiquement fonctionnelles.

### **EXEMPLE 3 : TRANSFERT DE GENES DANS LES TENOCYTES *IN VITRO***

Cet exemple montre la, possibilité de transférer efficacement des gènes dans des ténocytes *in vitro*. Pour le transfert de gènes *in vitro* (ou *ex vivo*), différentes techniques peuvent être utilisées. Dans les exemples, le transfert de gènes a été étudié *in vitro* sur des ténocytes par l'intermédiaire de plasmides ou de rétrovirus.

#### **3.1. Transfert de plasmides**

Les plasmides testés étaient de type LacZ (CMV-LacZ) et de type GFP (SV40-GFP et PET 47). Les transfections ont été réalisées avec 10 µg d'ADN par puits de 10 cm<sup>2</sup> contenant 2.10<sup>5</sup> ténocytes. Les plasmides ont été utilisés nus ou enrobés de PEI (30 µl à 10<sup>-2</sup> M par puits). L'efficacité du transfert était appréciée par lecture directe des puits, par comptage des cellules transduites après décollement (après coloration au X-Gal ou comptage par FACS) ou par la technique de chémi-luminescence.

Le 1<sup>er</sup> jour, les ténocytes étaient mis en culture sur des supports de 9 cm<sup>2</sup> de façon à obtenir le lendemain une confluence de 60 p.100.

Le 2<sup>ème</sup> jour, après retrait du milieu de culture usagé, un volume de 0,5 ml de solution de HBSS, contenant la quantité voulue de plasmide, était versé sur la monocouche de ténocytes. Puis le support était remis dans l'incubateur (à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) et un volume de 1,5 ml de milieu était ajouté 2 heures plus tard.

Le 3<sup>ème</sup> jour, l'efficacité de la transfection était évaluée.

Les résultats obtenus montrent que la transfection de ténocytes *in vitro* par des vecteurs non-viraux est possible. En particulier, les résultats obtenus montrent un taux de transfection, calculé sur 100 cellules en présence de PEI de l'ordre de 10%. L'activité β-galactosidase a été calculée, dans deux expériences, dans des puits de 10 cm<sup>2</sup> contenant des ténocytes transfectés par 10 µg d'ADN et 30 µl de PEI à 10<sup>-2</sup> M. Cette activité était de 9 pg et de 34,5 pg de β-galactosidase pour un témoin négatif à 0 pg. La transfection par le plasmide SV40-GFP (10 µg) enrobé de PEI (30 µl à 10<sup>-2</sup> M) montre également un taux de transfection calculé par FACS sur 1500 cellules de l'ordre de 24%.

Ces résultats montrent donc que les ténocytes, *in vitro*, peuvent être transfectés par des vecteurs non-viraux, en particulier par de l'ADN plasmidique.

### **3.2. Transfert par un rétrovirus**

5 Après leur titration sur cellules de référence, les vecteurs rétroviraux ont été utilisés pour infecter *in vitro* des ténocytes humains, de lapin et de souris. L'efficacité du transfert a été appréciée par lecture directe des puits, par comptage des cellules transduites après décollement ou par la technique de chémi-luminescence.

10 L'influence des conditions d'infection sur l'efficacité du transfert a été analysée en étudiant l'infection de ténocytes de lapin par des vecteurs rétroviraux de type GALV tout en faisant varier le taux de confluence des ténocytes et le rythme de renouvellement du surnageant viral.

L'efficacité de transduction des rétrovirus GALV 18 et  $\Psi$ crip-LLZ a été comparée  
15 en analysant, dans des conditions identiques, le taux et l'activité  $\beta$ -galactosidase des ténocytes transduits. Le taux d'expression de la  $\beta$ -galactosidase par un ténocyte transduit a été calculé, pour chacun des 2 types de rétrovirus, par le rapport du taux d'expression global sur le nombre total de ténocytes transduits.

Le 1<sup>er</sup> jour, les cellules étaient mises en culture sur des supports de 9 cm<sup>2</sup>  
20 de façon à obtenir le lendemain la confluence souhaitée.

Le 2<sup>ème</sup> jour, après retrait du milieu de culture usagé, chaque puits recevait un volume de 0,5 ml de surnageant contenant les virus, auquel était ajouté 4  $\mu$ l de Polybrène (soit 8  $\mu$ l / ml). Puis le support était remis dans l'incubateur (à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) et un volume de 1,5 ml de milieu frais était ajouté, dans  
25 chaque puits, 4 heures plus tard.

Le 3<sup>ème</sup> jour, l'analyse de l'efficacité de transfert était effectuée.

L'appréciation de l'efficacité du transfert était, soit réalisée par lecture directe sur supports de culture (estimation semi-quantitative), soit réalisée par comptage après décollement des cellules (valeur précise du taux de cellules transduites).

30 La fixation des cellules transduites par le gène GFP était réalisée par une solution de PBS contenant 1% de paraformaldéhyde, celle des cellules transduites par le gène Lac-Z utilisait une solution de PBS contenant 1% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde.

## Résultats

La titration des surnageants rétroviraux, produits par les cellules d'encapsulation  $\Psi$ crip-LLZ, a été effectuée sur des cellules 3T3 NIH (ensemencées à  $2 \cdot 10^5$  cellules par puits de  $10 \text{ cm}^2$ ). Le titre était de l'ordre de  $3 \cdot 10^5$  pfu/ml de surnageant.

La titration des surnageants rétroviraux, produits par les cellules d'encapsulation GALV 18, a été effectuée sur des cellules HCT 116 (ensemencées à  $5 \cdot 10^5$  cellules par puits de  $10 \text{ cm}^2$ ). Le titre variait de 2 à  $5 \cdot 10^5$  pfu/ml de surnageant.

## Infection des ténocytes de lapin par les vecteurs rétroviraux

### Influence des conditions d'infection sur le taux de transduction virale

Le taux de transduction *in vitro* des ténocytes de lapin, a été mesuré en faisant varier le taux de confluence des ténocytes et les conditions de contact avec le surnageant viral GALV 18 (fig.7). Le surnageant viral était utilisé pur pendant 4 heures et était renouvelé ou non. Les résultats ont été évalués par comptage manuel du nombre de ténocytes transduits dans un échantillon de 500 cellules (tableau II). Aucun ténocyte transduit n'était présent dans le témoin non infecté.

Le taux de transduction des ténocytes a semblé optimal au  $\frac{1}{4}$  de confluence et en l'absence de renouvellement du surnageant viral. Ce taux tendait à diminuer avec l'augmentation de la confluence des ténocytes et le nombre de renouvellements du surnageant.

### Comparaison du taux de transduction par les rétrovirus GALV 18 et $\Psi$ crip-LLZ:

La capacité d'infection des ténocytes de lapin par les vecteurs rétroviraux a été testée *in vitro* dans des puits de  $10 \text{ cm}^2$ , contenant  $7 \cdot 10^4$  cellules. Le taux de transduction des ténocytes a été calculé, à partir d'échantillons de 500 cellules, lors de 2 expériences utilisant le même surnageant viral. Le taux de transduction était de 0,6% et de 0,7% avec les rétrovirus  $\Psi$ crip-LLZ et, de 36,6% et de 39,8% avec les rétrovirus GALV 18. Dans les témoins (puits non infecté), aucun ténocyte n'était transduit.

L'activité  $\beta$ -galactosidase des ténocytes transduits, dans des puits de 10 cm<sup>2</sup>, par ces vecteurs rétroviraux, a été mesurée dans les mêmes conditions d'expérience. Cette activité était, après infection par les rétrovirus  $\Psi$ crip-LLZ, de 106 pg et 166 pg, soit 0,25 et 0,34 pg par ténocyte transduit. Elle était, après  
5 infection par les rétrovirus GALV 18, de 6274 pg et 8876 pg, soit 0,25 et 0,32 pg par ténocyte transduit. Le bruit de fond (cellules non infectées) était de 5 pg.

#### . Cinétique

L'évolution dans le temps du nombre total théorique de ténocytes transduits, après infection par des vecteurs rétroviraux de type GALV 18, est reportée dans  
10 le tableau III. Les résultats sont issus de 2 expériences utilisant des ténocytes infectés à passage 9 (exp. 1) et 18 passage (exp. 2). Compte tenu de l'évolution exponentielle, les résultats étaient exprimés en log du nombre de cellules obtenues et représentés sous forme de courbe (fig. 3). Une courbe de tendance,  
15 calculée pour chaque expérience, permettait d'apprécier la cinétique et d'extrapoler les résultats.

L'évolution du taux de cellules transduites a été analysée dans 2 expériences utilisant des ténocytes de lapin infectés, par des vecteurs rétroviraux de type GALV, à passage 9 (fig.4) et à passage 18 (fig.5). Les résultats, représentés  
20 sous forme de courbes, étaient exprimés par la moyenne de 2 mesures. L'intervalle de confiance avait la valeur d'un écart-type.

La présence du transgène dans les ténocytes était encore significative à 77 jours de recul de l'infection. Le taux des ténocytes transduits était relativement stable avec une tendance à l'augmentation.

#### Infection des ténocytes de souris par les vecteurs rétroviraux

L'infection des ténocytes de souris, par le vecteur rétroviral  $\Psi$ crip-LLZ, a été testée *in vitro* sur des cellules au 1/4 de confluence en utilisant du surnageant viral pur pendant 4 heures. Lors de l'infection de puits de 10 cm<sup>2</sup>, contenant  
30 1,4.10<sup>5</sup> ténocytes, le nombre de ténocytes transduits était de 245 par ml de surnageant viral pur.

### Infection de ténocytes humains par un rétrovirus

Les ténocytes humains en culture (passage P2) ont été incubés en présence de surnageant de rétrovirus GALV18, contenant le gène nls-LacZ, dans les conditions décrites ci-avant. Trois jours après l'infection, les cellules ont été  
5 fixées à la formaldéhyde et colorées au X-gal pour révéler l'expression du gène LacZ.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 13, et montrent une efficacité de transduction élevée des ténocytes humains. Ces résultats montrent donc que les ténocytes humains, en culture, peuvent être modifiés génétiquement de  
10 manière efficace, par l'emploi de rétrovirus, et peuvent donc acquérir des propriétés avantageuses pour les utilisations thérapeutiques de l'invention. Ces résultats sont également transposables à la modification génétique directe in vivo.

### 15 Constitution d'une lignée transduite par le gène nls-LacZ

Des ténocytes, issus d'explants de tendons rotuliens de lapin New Zealand, ont été infectés par des vecteurs rétroviraux de type GALV 18 véhiculant le gène nls-LacZ.

Les conditions d'infection étaient l'ensemencement de ténocytes, au 1/4 de  
20 confluence, dans une flasque de 150 cm<sup>2</sup> puis leur infection, pendant 4 heures, par un surnageant viral pur et non renouvelé. Le milieu, rajouté à 4 heures, contenait du DMEM supplémenté en vitamine C.

Les cultures étaient poursuivies, dans des flasques de 150 cm<sup>2</sup>, avec un repiquage au 1/4 de confluence chaque semaine. Lors de chaque décollement,  
25 l'examen d'un échantillon de cellules permettait de déterminer le nombre total de cellules obtenues. Le taux de cellules exprimant le transgène était calculé, après coloration au X-Gal, à partir de 2 mesures portant sur 500 cellules chacune.

Ces lignées, de passages 9 et 18, ont été utilisées pour analyser, après infection par des vecteurs de type GALV 18, l'évolution dans le temps du nombre des  
30 cellules transduites ainsi que la proportion de ces cellules au sein de la culture, la sélection des cellules transduites étant impossible avec le vecteur GALV 18. Les cultures étaient repiquées une fois par semaine, au 1/4 de confluence, dans des supports de 150 cm<sup>2</sup>. Lors du repiquage, le nombre de cellules utilisé ne

tenait compte que des cellules vivantes, après coloration au bleu Trypan. Le nombre total de cellules obtenues en une semaine était mesuré après retrait des cellules mortes en culture mais tenait compte des cellules mortes lors du décollement. Le comptage manuel des cellules était effectué, par 2 observateurs  
5 indépendants, à partir d'un échantillon de la suspension de cellules. L'évolution du nombre total théorique de ténocytes a pu être calculée et représentée sous forme de courbes. Le pourcentage de cellules transduites était mesuré, après coloration au X-Gal, par comptage manuel de 2 échantillons de 500 éléments. La mesure itérative du taux de cellules transduites a permis l'étude de la stabilité  
10 de ce taux, sur une période de plus de 45 jours, à partir de 2 lignées transduites.

#### **EXEMPLE 4 : TRANSFERT DE GENES DANS LES TENOCYTES *IN VIVO***

Cet exemple montre la possibilité de transférer des acides nucléiques recombinants dans les ténocytes *in vivo*. En particulier, cet exemple montre la  
15 possibilité de réaliser un transfert non-viral *in vivo*, notamment au moyen d'ADN nu.

Dans cet exemple, des essais de transfection par plasmide ont été effectués *in vivo* dans des tendons d'Achille.

Après détermination du volume injectable au niveau d'un tendon d'Achille de  
20 souris (< ou égal à 40 µl), des essais de transfert *in situ* ont été réalisés par l'injection de 20 et 40 µg de plasmides nus afin d'étudier la possibilité de transfection *in vivo* et d'évaluer la durée d'expression du transgène. Des expériences ont été réalisées afin d'améliorer l'efficacité du transfert. Différentes  
25 conditions de transfert ont été analysées en faisant varier la formulation du plasmide (nu ou enrobé de PEI), la quantité injectée (de 3,5 à 40 µg) et le volume injecté (de 0,5 à 40 µl). La technique d'injection était soit percutanée, soit à ciel ouvert.

Les résultats de ces transfections ont été appréciés qualitativement, par des  
30 examens macroscopiques et histologiques, et quantitativement par le dosage de l'activité β-galactosidase.



Un essai de transfert *in situ* a été réalisé par l'injection de 100 µg de plasmides nus dans des tendons d'Achille afin d'étudier la possibilité de transfection *in vivo* chez le lapin.

La tolérance des transfections a été étudiée macroscopiquement et par l'examen  
5 histologique utilisant notamment la contre-coloration des lames par l'HE.

#### **4.1. Modèles animaux**

Le 1<sup>er</sup> modèle utilisait des souris mâles adultes de type OF1, SPF (specific  
10 pathogen free), de 40 g (IFFA-CREDO®). L'anesthésie était assurée par  
l'utilisation d'Avertine® (tri-bromo-éthanol, à 25 mg/ml) à la dose de 250 mg/Kg,  
soit environ 400 µl administré par voie IP (intra-péritonéale). Le sacrifice des  
souris était réalisé par dislocation cervicale.

Le 2<sup>ème</sup> modèle utilisait un lapin mâle de type New Zealand, de 4 semaines,  
pesant 2,5 Kg (ESD 01-France). L'anesthésie était assurée par l'utilisation  
15 d'Hypnovel® 5 mg (1 ml) administré par voie IM et de Ketalar® (kétamine) à la  
dose de 80 mg/Kg administré par voie IM. Le sacrifice était réalisé par l'injection  
IV d'une dose létale (50 mg) de Nesdonal® (thiopental).

#### **4.2. Injection de plasmides nus ou enrobés**

20 Le plasmide utilisé, lors des transferts *in vivo*, était le CMV-LacZ. Un plasmide  
non LacZ (irrelevant), par exemple un plasmide GFP, était utilisé comme témoin  
négatif. Dans les expériences chez les souris, les plasmides ont été utilisés à  
différentes concentrations (de 1 µg/µl à 7,25 µg/µl) et sous différents volumes  
(de 0,5 à 40 µl). Chez le lapin, 100 µg de plasmide à 1 µg/µl ont été utilisés. Les  
25 plasmides étaient utilisés seuls (plasmides nus) ou combinés au PEI.

L'injection était effectuée dans et parallèlement au tendon, de façon ascendante,  
soit par voie percutanée, soit après incision cutanée permettant le contrôle visuel  
du positionnement de l'aiguille. Des seringues délivrant des microvolumes  
étaient utilisées (Hamilton®). Une 1<sup>ère</sup> série d'injections percutanées, avec du  
30 bleu de méthylène dilué au 1/10, a été réalisée afin de déterminer le volume  
maximal admissible en regard des tendons d'Achille de souris sans qu'il y ait de  
diffusion importante.

### **4.3. Résultats**

#### **Transfection *in vivo* dans des tendons d'Achille de souris**

- 5 Une première série d'injections de plasmide CMV-LacZ nu a été effectuée dans le but d'évaluer la possibilité de transfection *in situ*. L'expression du transgène a été analysée 48 heures et 96 heures après injections percutanées de plasmides CMV-LacZ nus dans les tendons d'Achille de 2 souris.

10 Il est apparu que le transfert après injection de 40 µg d'ADN semblait meilleur qu'après injection de 20 µg d'ADN. Le transgène était visible à J2 et à J4. Le transfert semblait juxta-tendineux et non présent sur toutes les coupes. L'examen de 2 tendons non injectés, par le plasmide CMV-LacZ, montrait l'absence d'activité β-galactosidase endogène.

15 La faisabilité de la transfection *in situ* au moyen du plasmide CMV-LacZ nu étant prouvée, la 2<sup>nd</sup>e étape a été l'étude de la durée d'expression du transgène. L'expression du gène Lac Z a été analysée à J2, J4 et J8 dans une série de 9 souris. Une injection percutanée de 40 µg de CMV-LacZ nu (1 µg/µl) était réalisée dans les tendons droits tandis qu'une injection percutanée de 40 µg d'ADN plasmidique non LacZ (irrelevant) nu (1 µg/µl) était réalisée dans les  
20 tendons gauches.

L'étude histologique a été réalisée aux 3 délais par coloration au X-Gal sur lame des tendons de 3 souris. L'examen de coupes transversales étagées montrait la présence du marqueur dans les tendons droits (sur une partie des coupes de chaque tendon) et l'absence du marqueur sur toutes les coupes de tendons  
25 gauches constituant les témoins négatifs. L'examen exhaustif des tendons par des coupes transversales se révélait impossible à réaliser car il aurait nécessité plus de 400 coupes par tendon de souris.

L'examen des tendons de 6 souris, par la technique de coloration au X-Gal *in toto*, a permis de voir macroscopiquement une zone bleue à J2 et J8. Des  
30 coupes transversales, orientées sur ces zones bleues, permettaient de retrouver des plages de cellules transduites.

En résumé, le transgène a été uniquement retrouvé sur les tendons injectés par le plasmide CMV-LacZ nu, aux 3 délais de J2, J4 et J8, et l'expression du

transgène était paratendineuse. Aucune réaction inflammatoire n'a été mise en évidence, ni macroscopiquement, ni histologiquement.

#### Comparaison de l'injection de plasmides CMV-LacZ nus et enrobés de PEI

L'influence d'un agent facilitant (PEI) sur le transfert *in vivo* a été évaluée. Cette étude, effectuée au temps précoce, a analysé les résultats de l'injection de plasmides CMV-LacZ, nus ou enrobés de PEI, dans 4 tendons d'Achille de souris. Les plasmides ont été injectés, sous un même volume (40 µl), sous contrôle de la vue après incision cutanée.

Il était apparu, lors des injections, qu'au-delà de 10 µl le liquide refluit hors du tendon. De même, l'aiguille devait rester en place au minimum une minute pour éviter ce reflux lors du retrait de l'aiguille.

La technique de coloration au X-Gal *in toto*, effectuée à 48 H, a montré sur des coupes transversales centrées sur les zones macroscopiquement bleues des tendons, la présence d'une activité β-galactosidase dans la profondeur des tendons (figures 9). La différence d'intensité de transfection, entre plasmides nus et enrobés de PEI, n'a pas pu être quantifiée sur les coupes histologiques. La coloration, également appliquée sur les tissus péri-tendineux à la recherche d'une diffusion, a montré l'absence de β-galactosidase en position péri-tendineuse tendons.

#### Injection de plasmides CMV-LacZ nus après incision cutanée

La réalisation d'une incision cutanée, lors de l'injection des plasmides, permettait le contrôle visuel de l'injection, comme cela a été montré dans l'étude précédente. Afin de valider cette technique, l'analyse de l'expression du transgène a été réalisée sur les tendons de 3 souris. Ces tendons ont été injectés avec 40 µg de plasmide CMV-LacZ nu du côté droit (sous 40 µl) et avec 40 µg de plasmide non LacZ du côté gauche (sous 40 µl). Le transfert du gène Lac Z a été analysé par coloration au X-Gal *in toto*, c'est à dire sur tout le prélèvement (muscle-tendon et tissus péri-tendineux), à 48 heures. Le résultat macroscopique était très positif sur les 3 tendons droits et négatif sur les tendons gauches servant de contrôle (figures 9). Les zones de transduction, bleues, étaient très limitées et localisées sur le tendon et le paratendon. Les coupes histologiques, de bonne qualité, montraient la présence du transgène à l'intérieur du tendon, prouvant la possibilité de transduction des cellules intra-tendineuses par une technique d'injection adaptée. Dans tous les cas, les zones de

transfection étaient localisées, voire limitées à la zone de traumatisme du biseau de l'aiguille (figure 9).

L'intensité d'expression du gène Lac Z a été étudiée à 48 heures de la transfection *in situ* des tendons d'une série de 4 souris. Les tendons étaient injectés, sous contrôle de la vue, avec un volume de 20 µl contenant 40 µg d'ADN (2 µg/µl). Six des huit tendons ont été injectés avec le plasmide CMV-LacZ, les deux autres par un plasmide non LacZ (témoins). Après prélèvement, à 48 heures, les tendons ont été répartis au hasard dans deux groupes, chacun des groupes ayant un tendon témoin. Le 1<sup>er</sup> groupe a été étudié par la technique de coloration au X-gal *in toto* tandis que le 2<sup>nd</sup> groupe était étudié en utilisant le kit de chimi-luminescence permettant la quantification de l'activité β-galactosidase. Le but de l'étude par ces 2 techniques, en parallèle, était de vérifier que la technique du kit, analysant uniquement le tendon, s'effectuait sur des tendons réellement transduits comme pouvaient le montrer les études macroscopiques et histologiques réalisées sur l'autre groupe de tendons.

La technique de coloration au X-gal *in toto*, de bonne qualité technique, a confirmé la présence de cellules transduites dans les tendons injectés par le plasmide CMV-LacZ alors que le tendon témoin était négatif.

La quantification de l'activité β-galactosidase, par le kit de chimi-luminescence, a montré un taux d'expression proche dans les 3 tendons injectés par le plasmide CMV-LacZ (tableau IV). Chaque mesure a été effectuée 2 fois, la conversion effectuée à partir de la gamme avait un coefficient de détermination R<sup>2</sup> égal à 0,998, témoignant de la précision du calcul de conversion.

#### Injections de plasmides CMV-LacZ nus sous différents volumes et concentrations

Différentes possibilités de formulation des plasmides ont été analysées en vue de l'optimisation du transfert *in situ*. Le but était d'abord d'étudier l'influence des volumes injectés sous une concentration donnée. Afin de conserver une quantité suffisante de plasmides, le volume maximal injectable dans un tendon étant de 10 µl, la concentration utilisée était de 7,25 µg/µl. Différentes conditions de transfection *in vivo* ont été étudiées, 48 heures après l'injection de plasmides CMV-LacZ nus, dans une série de 5 souris. Neuf tendons ont été injectés avec un volume variable, de 0,5 à 8 µl, de plasmides CMV-LacZ. Le dernier tendon,

servant de contrôle, a été injecté avec un plasmide non LacZ. Les résultats de ces transfections ont été évalués par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase en utilisant le kit de chémi-luminescence. Les résultats de deux mesures distinctes, réalisées à des temps différents, montraient la variation des valeurs de chaque échantillon (tableau V).

#### **Transfection *in vivo* dans des tendons d'Achille de lapin.**

L'étude de la distribution du gène LacZ, après injection intra-tendineuse pure de 100  $\mu$ g de plasmide CMV-LacZ nu dosé à 1  $\mu$ g/ $\mu$ l dans deux tendons d'Achille de lapin, a montré l'efficacité du transfert plasmidique. La mise en évidence du transfert a été effectuée par la coloration standard au X-Gal. Les coupes histologiques transversales, réalisées à 24 H, étaient dirigées sur la zone injectée. Le transfert était strictement intra-tendineux et aucune coloration n'était visible en dehors du trajet d'injection. Compte tenu de la grande taille des tendons, quelques coupes seulement ont pu être réalisées.

#### **Analyse de la tolérance des transfections *in vivo*.**

Lors de l'examen macroscopique des tendons de souris ou de lapin, aucun signe d'inflammation n'a été vu que ce soit au niveau du tendon, des tissus péri-tendineux ou de l'articulation de la cheville.

Lors de l'analyse microscopique, améliorée par la contre-coloration à l'HE, aucune infiltration de cellules mononucléées n'a été vue autour des ténocytes transduits par le gène LacZ.

L'ensemble des résultats obtenus montre donc que le transfert de plasmides *in vivo* dans les ténocytes est possible, avec de l'ADN nu ou associé à un agent facilitant (type polymère cationique), que ce transfert permet l'expression d'un gène recombinant dans les ténocytes *in vivo*, et que le transfert n'induit pas d'inflammation autour des cellules transduites ni de modification du volume du tendon.

## **EXEMPLE 5 : IMPLANTATION IN VIVO DE TENOCYTES MODIFIES GENETIQUEMENT EX VIVO**

Des essais de transfert de gène ont été effectués dans des tendons par l'intermédiaire de ténocytes homologues modifiés génétiquement ex vivo (en particulier transduits par des rétrovirus GALV 18).

Un 1er essai a étudié la possibilité de détecter l'expression précoce du transgène, lors de la réimplantation de  $5 \cdot 10^6$  ténocytes transduits. Les essais suivants ont évalué la durée d'expression du transgène par une analyse à différents délais (de 24 heures à 26 jours) après implantation de  $5 \cdot 10^6$  ténocytes transduits. La tolérance du transfert ex vivo a été particulièrement étudiée lors d'examens macroscopiques et histologiques.

### **5.1. Modèle animal**

Des lapins mâles de type New Zealand, de 4 semaines, pesant 2,5 Kg (ESD 01-France) ont été utilisés. L'anesthésie était assurée par l'utilisation d'Hypnovel® 5 mg (1 ml) administré par voie IM et de Ketalar® (kétamine) à la dose de 80 mg/Kg administré par voie IM. Le sacrifice était réalisé par l'injection IV d'une dose léthale (50 mg) de Nesdonal® (thiopental).

### **5.2. Préparations cellulaires**

Les cellules, implantées ou réimplantées, étaient des ténocytes autologues ou homologues (allogéniques). Un nombre variable de ténocytes (de  $2 \cdot 10^6$  à  $5 \cdot 10^6$  cellules), contenus dans un volume de 250 µl d'une solution de DMEM, a été utilisé. Les ténocytes étaient fraîchement infectés, ou issus d'une lignée transduite, par des vecteurs de type GALV 18 véhiculant le gène nls-LacZ.

### **5.3. Injection des cellules**

La zone opératoire était préparée en respectant les conditions d'asepsie chirurgicale. L'injection de la préparation cellulaire était effectuée, dans le tendon ou dans sa gaine, parallèlement au tendon et après incision cutanée permettant le contrôle visuel. Une seringue d'un ml, de type « insuline », était utilisée avec

une aiguille de 22 G. L'incision cutanée était refermée par une suture simple au fil de nylon.

#### **5.4. Résultats**

- 5 Les essais de transfert ex vivo ont été effectués sur des tendons rotuliens de lapins mâles de type New Zealand, âgés de 4 semaines.

##### **Etude du transfert au temps précoce**

Dans le but d'évaluer la possibilité du transfert de gène ex vivo, l'expression du transgène dans des tendons rotuliens sains a été analysée à court terme. La réimplantation, dans chacun des tendons rotuliens d'un lapin, de  $5 \cdot 10^6$  ténocytes homologues a été étudiée à un délai de 24 heures. Parmi ces ténocytes de passage 18 et fraîchement infectés, 60 p.100 étaient transduits. L'implantation de ces ténocytes était effectuée dans des tendons intacts, après incision cutanée épargnant la gaine. Le 1<sup>er</sup> côté était injecté dans la gaine et le tendon, le 2<sup>nd</sup> dans le tendon uniquement.

Les analyses macroscopiques et histologiques (coloration sur lames), réalisées à 24 heures, ont montré l'absence d'adhérence cutanée et de réaction inflammatoire (articulaire et extra-articulaire). Le gène marqueur a été très nettement détecté sur les coupes histologiques avec la technique de coloration au X-Gal sur lames (Figure 10).

##### **Etude de la durée de détection du transgène**

###### **Analyse du transfert de J2 à J8**

L'analyse effectuée au temps précoce ayant montré la possibilité de réalisation du transfert ex vivo et sa détection par la technique histologique de coloration sur lames, une 2<sup>nde</sup> étude a consisté à étudier la durée d'expression du transgène dans des tendons intacts de lapin. La réimplantation, dans chacun des tendons rotuliens, de  $5 \cdot 10^6$  ténocytes homologues a été étudiée à un délai de 2, 4 et 8 jours. Parmi ces ténocytes (de passage 28 issus d'une lignée infectée à passage 18), 88 p.100 étaient transduits. L'implantation de ces ténocytes était effectuée à l'intérieur des tendons, après incision cutanée épargnant la gaine. Le 1<sup>er</sup> côté était injecté avec des ténocytes transduits, le 2<sup>nd</sup>

avec des ténocytes non transduits.

L'analyse macroscopique a montré l'absence d'adhérence cutanée et de réaction inflammatoire (articulaire et extra-articulaire). Un épaissement de la gaine a été constaté jusqu'à 4<sup>ème</sup> jour.

- 5 L'analyse histologique par coloration au X-Gal sur lames a montré la présence du gène marqueur à J2, J4 et J8 (figure 10). Toutes les coupes de tendons ayant reçus des ténocytes transduits montraient la présence du gène marqueur, tandis que les coupes de tendons témoins montraient l'absence de ce gène. Les cellules transduites étaient moins visibles et semblaient dispersées à J8,
- 10 l'analyse au fort grossissement montrait cependant la persistance du transgène.

- L'injection de  $5.10^6$  ténocytes homologues a été étudiée dans 4 tendons rotuliens intacts à un délai de 48 heures. Parmi ces ténocytes (de passage 32, issus d'une lignée infectée à passage 18), 89 p.100 étaient transduits. L'implantation de ces ténocytes a été effectuée à l'intérieur de tendons, après
- 15 incision cutanée épargnant la gaine. Le 1<sup>er</sup> côté était injecté avec des ténocytes transduits, le 2<sup>nd</sup> avec des ténocytes non transduits.

- La visualisation macroscopique de l'expression du transgène a permis de localiser la zone de transduction sur le tendon et d'orienter les coupes. Les ténocytes transduits ont été trouvés dans le tendon mais aussi dans sa gaine
- 20 (figure 11). Sur le tendon témoin, aucune transduction n'était visible ni dans la gaine, ni dans le tendon (figures 11). L'étude des tissus péri-tendineux, à la recherche d'une diffusion du marqueur au-delà de la gaine, a montré l'absence de celui-ci. La technique de coloration *in toto* s'est révélée de bonne qualité histologique et permettant une contre-coloration par l'HE. Les coupes de
- 25 tendons témoins confirmaient l'absence de transgène

Avec la technique du kit de chimi-luminescence, l'activité  $\beta$ -galactosidase, mesurée dans un tendon transduit, était de 4070 pg pour un témoin à 0 pg.

#### Analyse du transfert de J8 à J26

- Après l'amélioration des méthodes d'analyse du transfert *ex vivo*, il était
- 30 intéressant d'étudier la durée d'expression du transgène dans des tendons intacts au-delà de 8 jours. La réimplantation de  $5.10^6$  ténocytes homologues, par tendon rotulien, a été étudiée à un délai de 8, 14 et 26 jours. Parmi ces ténocytes (de passage 33, issus d'une lignée infectée à passage 18), 94 p.100 étaient transduits. L'implantation était effectuée à l'intérieur des tendons, après



incision cutanée épargnant la gaine. Les 2 côtés étaient injectés avec des ténocytes transduits. Les contrôles négatifs de coloration étaient les tendons d'Achille des mêmes lapins injectés par des ténocytes non transduits.

Une analyse a été effectuée en parallèle avec du 1<sup>er</sup> côté, la technique de coloration *in toto*, et du 2<sup>nd</sup> côté, la quantification de l'activité  $\beta$ -galactosidase par le kit de chimi-luminescence.

L'analyse macroscopique montrait l'absence d'adhérence cutanée et de réaction inflammatoire (articulaire et extra-articulaire). La visualisation macroscopique de l'expression du transgène était possible sur le tendon jusqu'à J14.

L'analyse histologique, par la technique de coloration *in toto*, montrait la persistance du gène marqueur à J8, J14 et J26 sur des coupes centrées sur la zone colorée visible macroscopiquement. Neuf coupes ont été effectuées par tendon. Toutes les coupes de tendons, ayant reçus des ténocytes transduits, montraient la présence du gène marqueur, tandis que celles des tendons témoins montraient l'absence de ce gène. La dispersion dans le tendon des cellules transduites augmentait de J8 à J26. La qualité des coupes par coloration *in toto* était comparable à celle de la technique classique, comme le montrent les lames réalisées à 8 jours de recul. Au dernier délai, des images de réaction à corps étranger étaient visibles autour d'amas de  $\beta$ -galactosidase.

#### **Analyse de la tolérance du transfert de gènes *ex vivo***

Lors de l'examen macroscopique des tendons rotuliens après implantation de ténocytes transduits, aucun signe d'inflammation n'a été vu que ce soit au niveau du tendon, des tissus péri-tendineux ou de l'articulation du genou.

Lors de l'analyse microscopique, améliorée par la contre-coloration à l'HE, aucune infiltration de cellules mononucléées n'a été vue autour des ténocytes homologues, transduits ou non, dans les phases précoces.

### **RESUME**

En résumé, les résultats obtenus montrent en particulier que :

- des ténocytes peuvent être isolés à partir de tendons puis cultivés en masse afin d'effectuer leur réimplantation,

- les ténocytes peuvent être transduits très efficacement *in vitro* par l'intermédiaire des vecteurs rétroviraux GALV 18,

- l'expression d'un transgène dans les ténocytes transduits par un vecteur rétroviral est stable en culture au-delà de 45 jours,

5      

- le transfert d'un gène est possible *in vivo*, par l'intermédiaire de plasmides nus ou enrobés de PEI, avec une persistance de l'expression à 8 jours,

- l'expression d'un transgène *in vivo*, après implantation dans les tendons de ténocytes transduits, est encore présente à 26 jours.

## REFERENCES

1. Catonné et al., Catonné Y, Saillant G. ed. Lésions traumatiques des tendons chez le sportif Paris :Masson, 1992 : 3-8.
- 5 2. Christel P., J. Traumatol.Sport. 14 (1997) 66
3. Imbert JC, J. Traumatol.Sport. 14 (1997) 107
4. Poddevin et al., Rev.Chir.Orthop.Rappar.Apar.Mot 81 (1995) 410
5. Natsu-ume et al., J. Orthop. Res 15 (1997) 837
6. Panossian et al., Clin. Orthop. 342 (1997) 173
- 10 7. Lee et al., Orthop. J. 18 (1998) 19
8. Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd edition New York: Cold Spring Harbor Lab. Press 1989
9. Miller et al., J. Virol 65 (1991) 2220
10. Bernard-Beaubois et al., Cell. Biol. Toxicol. 13 (1997) 103
- 15 11. Cao et al., Transplant. Proc. 26 (1994) 3390
12. Kao et al., Arch. Biochem. Biophys. 173 (1976) 638
13. Anselme et al., Rev.Chir.Orthop.Rappar.Apar.Mot 82 (1996) 709

**Tableau I: Temps de doublement des ténocytes de lapin *in vitro*.**

N° de repiquage	Temps de doublement (heures)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Expérience 1</b>	105	325	95	247	297	220	319	198	121	79
<b>Expérience 2</b>	277	80	58	59	73	54	40			

5

**Tableau II: Taux d'infection des ténocytes de lapin en fonction de leur taux de confluence et du renouvellement ou non du surnageant viral.**

	surnageant unique	surnageant renouvelé 1 fois	surnageant renouvelé 2 fois
<b>25% confluence</b>	81,8%	74,7%	72,8%
<b>50% confluence</b>	79,4%	73,2%	71,8%
<b>75% confluence</b>	57,7%	59,7%	50,9%

10

**Tableau III:** Evolution du nombre total théorique de ténocytes transduits.

<b>Délais (jours)</b>	<b>Nombre de ténocytes (exp. 1)</b>	<b>Nombre de ténocytes (exp. 2)</b>
<b>0</b>	$1,2.10^6$	$1,2.10^6$
<b>7</b>	$1,8.10^6$	$1,8.10^6$
<b>14</b>	$3,6.10^6$	$6,7.10^6$
<b>21</b>	$1,2.10^7$	$7,1.10^7$
<b>29</b>	$2,7.10^7$	$5,8.10^8$
<b>35</b>	$4,7.10^7$	$3,8.10^9$
<b>42</b>	$9,8.10^7$	$4,5.10^{10}$
<b>49</b>	$1,0.10^8$	$5,2.10^{11}$
<b>56</b>	$2,1.10^8$	
<b>63</b>	$6,4.10^8$	
<b>70</b>	$2,4.10^9$	
<b>77</b>	$1,8.10^9$	

**Tableau IV:** Taux de  $\beta$ -galactosidase détecté par le kit de  
chémi-luminescence à 48 heures.

	<b>Tendon 1</b>	<b>Tendon 2</b>	<b>Tendon 3</b>	<b>Tendon 4</b>
<b>Plasmide</b>	CMV-LacZ	CMV-LacZ	CMV-LacZ	non LacZ
<b>Mesure 1 (pg)</b>	393,7	425,3	352,9	21,5
<b>Mesure 2 (pg)</b>	361,4	399,8	341,2	17,1

5

**Tableau V:** Taux de  $\beta$ -galactosidase lors du transfert *in situ* par le plasmide  
CMV-LacZ nu.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
Plasmide	LZ	LZ	LZ	LZ	LZ	LZ	LZ	LZ	LZ	No
Volume ( $\mu$ l)	0,5	0,5	1	1	2	2	4	4	8	8
Concentr ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	2
Quantité ( $\mu$ g)	3,625	3,625	7,25	7,25	14,5	14,5	29	29	58	16
Mesure 1 (pg)	6,6	8,8	9,7	9,5	35,5	44,1	58,6	100,0	124,6	13,9
Mesure 2 (pg)	16,4	26,4	21,4	26,7	79,5	44,0	89,2	99,7	227,2	29,6

LZ : LacZ

**Note:** Réalisation de 2 mesures (1 et 2), à des temps différents.

10

## REVENDICATIONS

1. Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules ténocytes autologues et/ou allogéniques d'origine humaine.
- 5 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une culture in vitro ou ex vivo de ténocytes autologues et/ou allogéniques.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes humains autologues et/ou allogéniques modifiés génétiquement.
- 10 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, comprise dans un dispositif de type ampoule, seringue, fiole, poche ou boîte.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir de tendon.
- 15 6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir du tendon d'un muscle de la région patte d'oie, du tendon du muscle petit palmaire, du tendon du muscle plantaire grêle, du tendon du muscle péronier antérieur, du tendon quadricipital, du tendon rotulien ou du tendon d'Achille.
- 20 7. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir de ligament.
8. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir d'une aponévrose.
9. Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend des ténocytes humains ou équins modifiés génétiquement et un excipient.
- 25 10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle comprend des ténocytes humains modifiés génétiquement.
11. Cellule ténocyte isolée et modifiée génétiquement, caractérisée en ce qu'elle contient un acide nucléique recombinant codant un facteur de croissance et/ou un facteur inhibant la réaction inflammatoire.
- 30 12. Composition comprenant des ténocytes congelés.

13. Composition pour la conservation de ténocytes, comprenant des ténocytes et au moins un composé choisi parmi :

- a. du diméthyl sulfoxyde
- b. une gélatine modifiée
- c. un polysaccharide, ou
- d. du glycérol.

14. Utilisation de ténocytes humains pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation in vivo.

15. Utilisation, selon la revendication 14, de ténocytes pour la préparation d'une composition destinée à la mise en œuvre d'une méthode de traitement thérapeutique, diagnostique ou chirurgical du corps humain.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes autologues, allogéniques ou xénogéniques.

17. Utilisation selon l'une des revendications 14 à 16 caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes cultivés in vitro.

18. Utilisation selon l'une des revendications 14 à 17 caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes modifiés génétiquement.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes contenant un acide nucléique recombinant codant un facteur de croissance et/ou un facteur inhibant la réaction inflammatoire.

20. Procédé de modification génétique d'un ténocyte in vitro ou ex vivo, comprenant la mise en contact d'un ténocyte avec (i) de l'ADN nu ou (ii) un rétrovirus recombinant pseudotypé avec une enveloppe GALV.

21. Utilisation d'une composition comprenant (i) de l'ADN nu ou (ii) un rétrovirus recombinant pseudotypé avec une enveloppe GALV, pour la préparation d'une composition destinée au transfert de cet ADN dans les ténocytes in vivo.

22. Utilisation d'un acide nucléique recombinant pour la préparation d'une composition destinée à la modification génétique in vivo d'un ténocyte humain.



23. Utilisation, selon la revendication 14, d'une population de ténocytes ou de fibroblastes, autologues allogéniques ou xénogéniques, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation ou l'administration dans un tendon ou ligament.

5 24. Utilisation selon la revendication 14, d'une population de ténocytes ou de fibroblastes, autologues allogéniques ou xénogéniques, pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la cicatrisation d'une déchirure ou rupture musculaire.

25. Procédé de production de ténocytes, comprenant :

- 10 - le prélèvement d'un fragment de tissu biologique comprenant des ténocytes, de préférence d'origine humaine,
- le traitement de ce fragment pour dissocier les ténocytes, en présence d'une collagénase, et
- 15 - la mise en culture des ténocytes, et leur multiplication in vitro par passages successifs, de préférence par ensemencement à une densité correspondant au quart de la confluence environ.

26. Procédé selon la revendication 25, comprenant une étape de congélation des ténocytes, de préférence dans un milieu selon la revendication 13.

20 27. Procédé selon la revendication 25 ou 26, comprenant une étape de modification génétique des ténocytes, de préférence selon la revendication 20.

**REVENDICATIONS MODIFIEES**

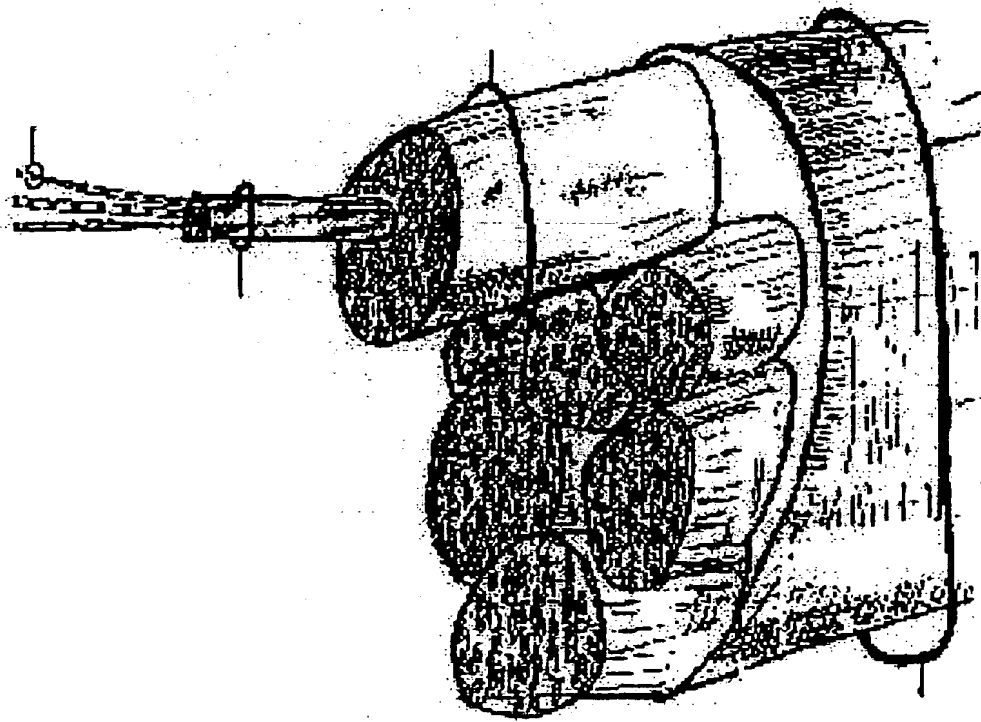
[reçues par le Bureau international le 7 mars 2001 (07.03.01);  
revendications originales 1-27 remplacées par de nouvelles  
revendications 1-26 (3 pages)]

1. Composition, caractérisée en ce qu'elle comprend des cellules ténocytes autologues et/ou allogéniques d'origine humaine.
- 5 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une culture in vitro ou ex vivo de ténocytes autologues et/ou allogéniques.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes humains autologues et/ou allogéniques modifiés génétiquement.
- 10 4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, comprise dans un dispositif de type ampoule, seringue, fiole, poche ou boîte.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir de tendon.
- 15 6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir du tendon d'un muscle de la région patte d'oie, du tendon du muscle petit palmaire, du tendon du muscle plantaire grêle, du tendon du muscle péronier antérieur, du tendon quadricipital, du tendon rotulien ou du tendon d'Achille.
- 20 7. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir de ligament.
8. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes préparés à partir d'une aponévrose.
9. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend des ténocytes humains modifiés génétiquement et un excipient.
- 25 10. Composition selon la revendication 3 ou la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle comprend des ténocytes modifiés génétiquement à l'aide d'un acide nucléique recombinant codant un facteur de croissance et/ou un facteur inhibant la réaction inflammatoire.
- 30 11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10 comprenant des ténocytes congelés.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11 pour la conservation de ténocytes, comprenant des ténocytes et au moins un composé choisi parmi :
- a. du diméthyl sulfoxyde
  - 5       b. une gélatine modifiée
  - c. un polysaccharide, ou
  - d. du glycérol.
13. Utilisation de ténocytes humains pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation in vivo.
- 10   14. Utilisation, selon la revendication 13, de ténocytes pour la préparation d'une composition destinée à la mise en œuvre d'une méthode de traitement thérapeutique, diagnostique ou chirurgical du corps humain.
- 15   15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes autologues, allogéniques ou xénogéniques.
16. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 15 caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes cultivés in vitro.
17. Utilisation selon l'une des revendications 13 à 16 caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes modifiés génétiquement.
- 20   18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'il s'agit de ténocytes contenant un acide nucléique recombinant codant un facteur de croissance et/ou un facteur inhibant la réaction inflammatoire.
- 25   19. Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 3 ou 9, comprenant la mise en contact, in vitro ou ex vivo, d'un ténocyte avec (i) de l'ADN nu ou (ii) un rétrovirus recombinant pseudotypé avec une enveloppe GALV.
20. Utilisation d'une composition comprenant (i) de l'ADN nu ou (ii) un rétrovirus recombinant pseudotypé avec une enveloppe GALV, pour la préparation d'une composition destinée au transfert in vivo de cet ADN dans les ténocytes humains.

21. Utilisation d'un acide nucléique recombinant pour la préparation d'une composition destinée à la modification génétique in vivo d'un ténocyte humain.
- 5 22. Utilisation, selon la revendication 13, d'une population de ténocytes ou de fibroblastes, autologues allogéniques ou xénogéniques, pour la préparation d'une composition destinée à l'implantation ou l'administration dans un tendon ou ligament.
- 10 23. Utilisation selon la revendication 13, d'une population de ténocytes ou de fibroblastes, autologues allogéniques ou xénogéniques, pour la préparation d'une composition destinée à favoriser la cicatrisation d'une déchirure ou rupture musculaire.
24. Procédé de production d'une composition selon la revendication 1, comprenant :
- 15 - le prélèvement d'un fragment de tissu biologique comprenant des ténocytes, d'origine humaine,
- le traitement de ce fragment pour dissocier les ténocytes, en présence d'une collagénase, et
- 20 - la mise en culture des ténocytes, et leur multiplication in vitro par passages successifs, de préférence par ensemencement à une densité correspondant au quart de la confluence environ.
25. Procédé selon la revendication 24, comprenant une étape de congélation des ténocytes, de préférence dans un milieu selon la revendication 12.
26. Procédé selon la revendication 24 ou 25, comprenant une étape de modification génétique des ténocytes, de préférence selon la
- 25 revendication 19.

FIGURE 1



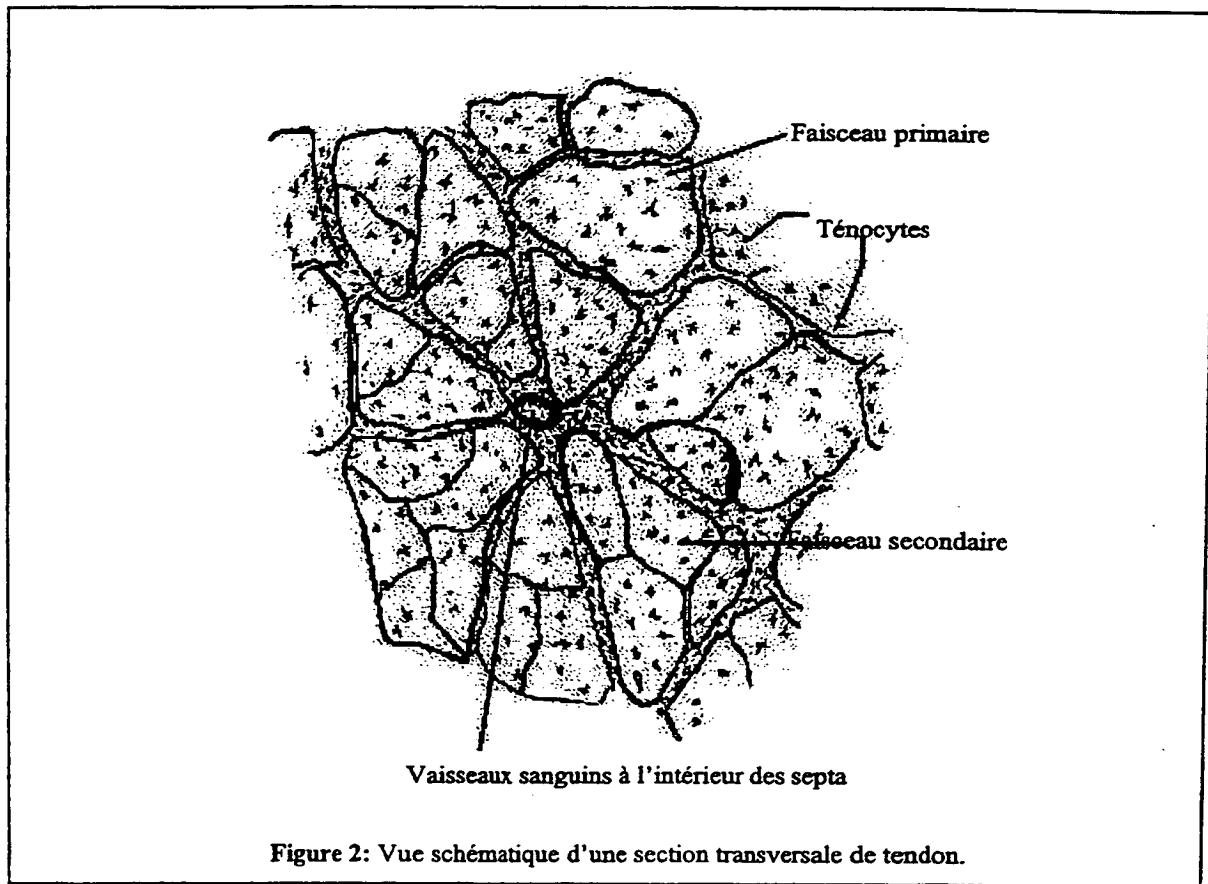


FIGURE 2

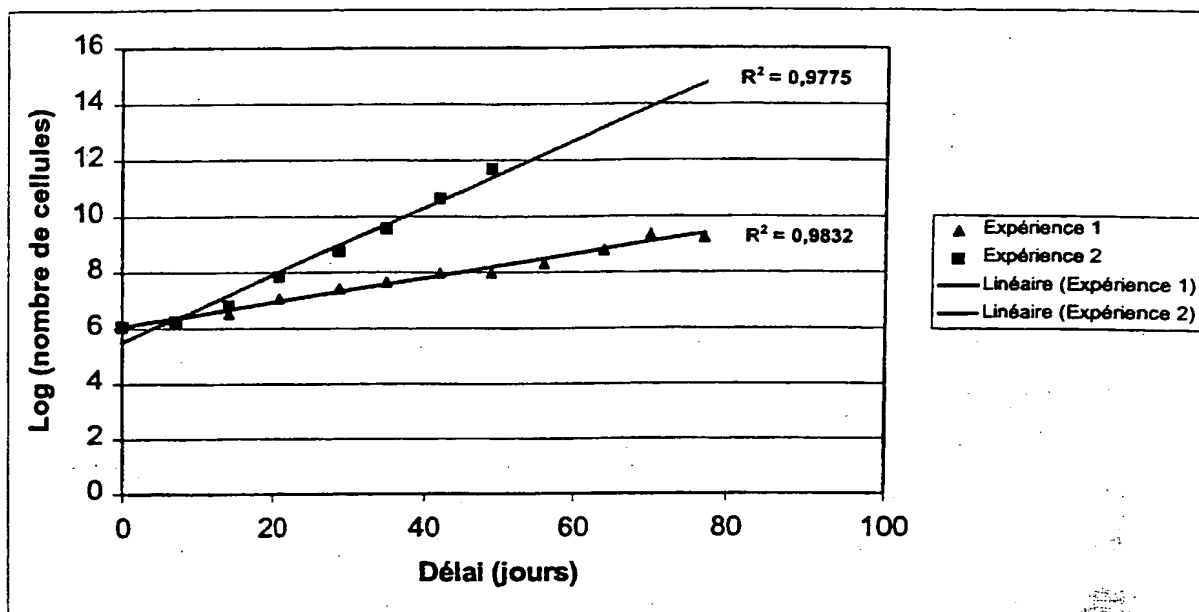


FIGURE 3

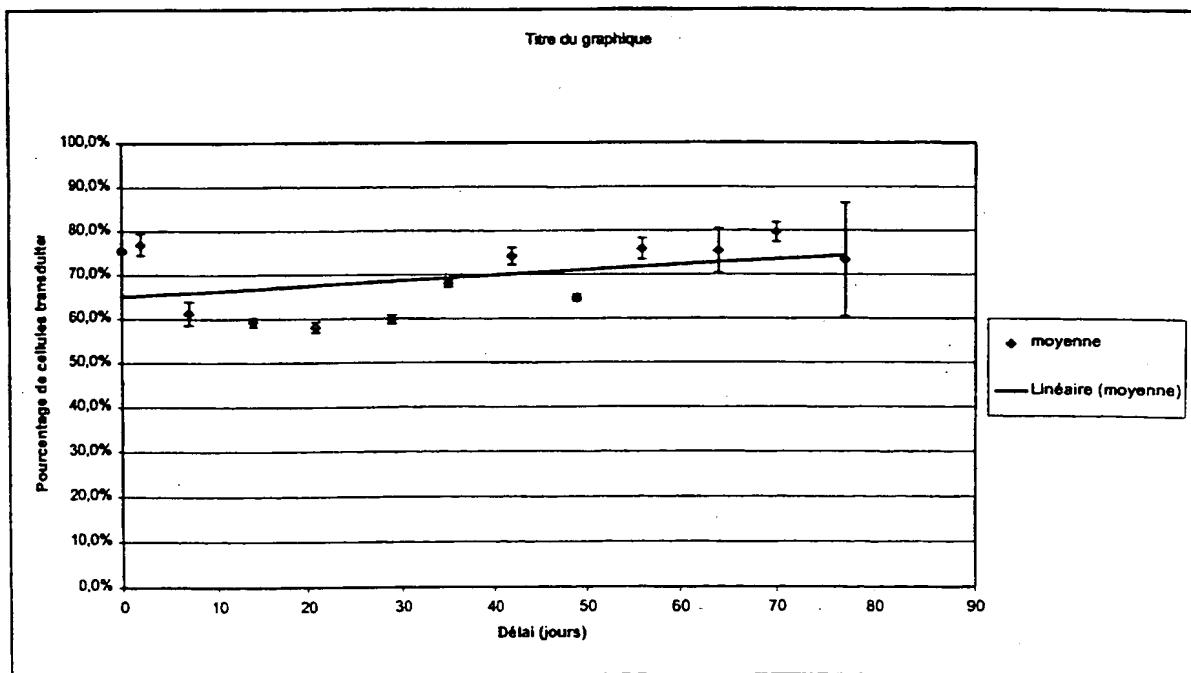


FIGURE 4

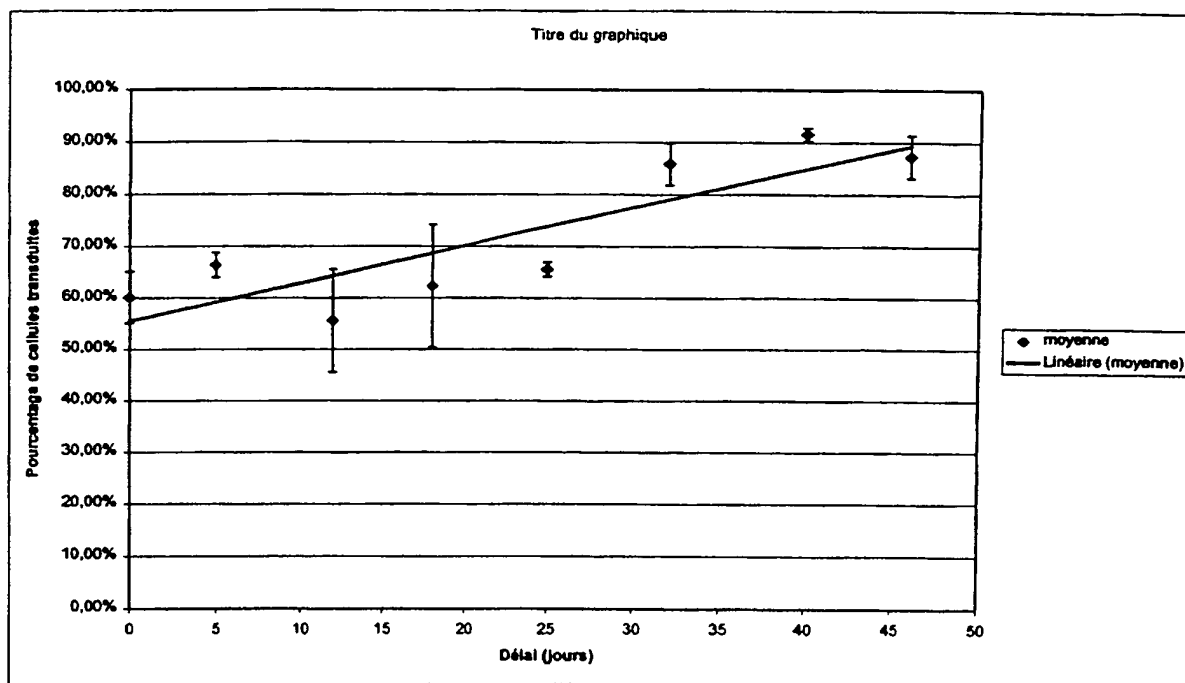


FIGURE 5

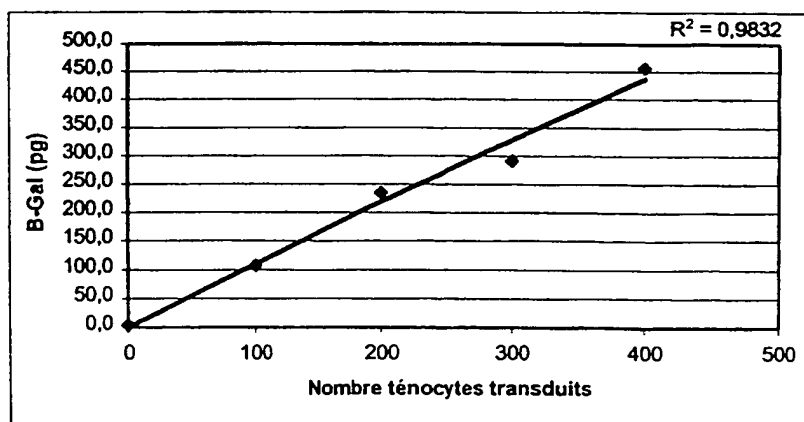


FIGURE 6



5/8

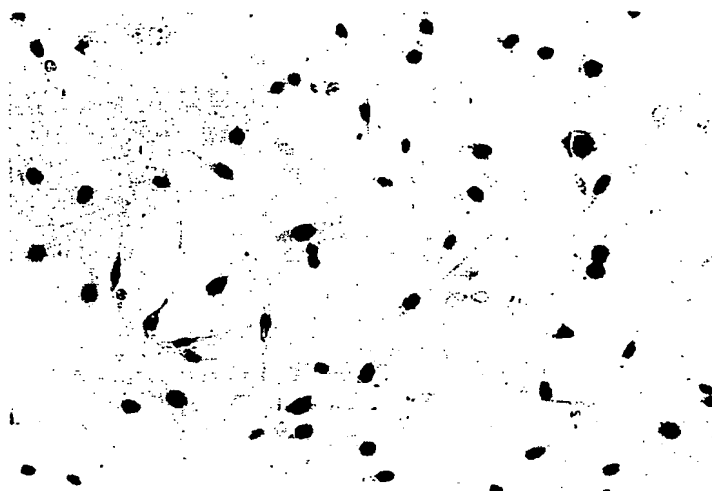


Figure 7



Figure 8



Figure 9

6/8



Figure 10



Figure 11

7/8

Fig. 12a

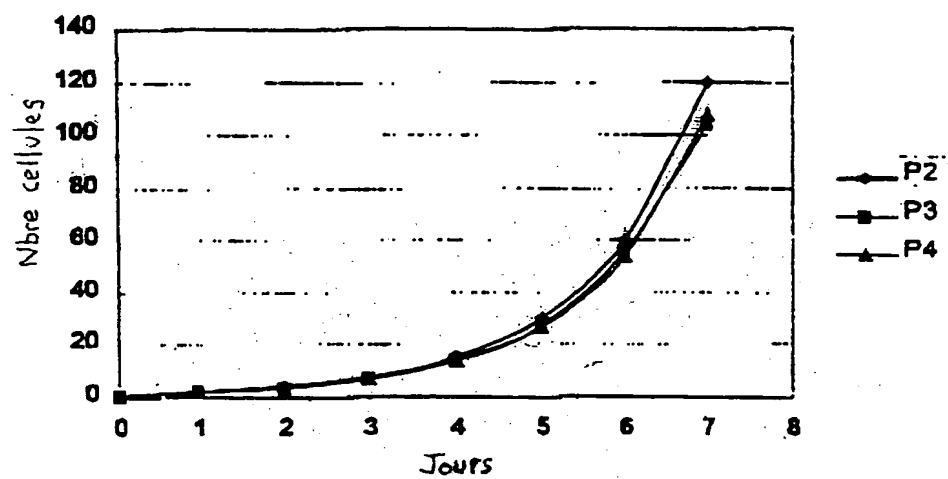


Fig. 12b

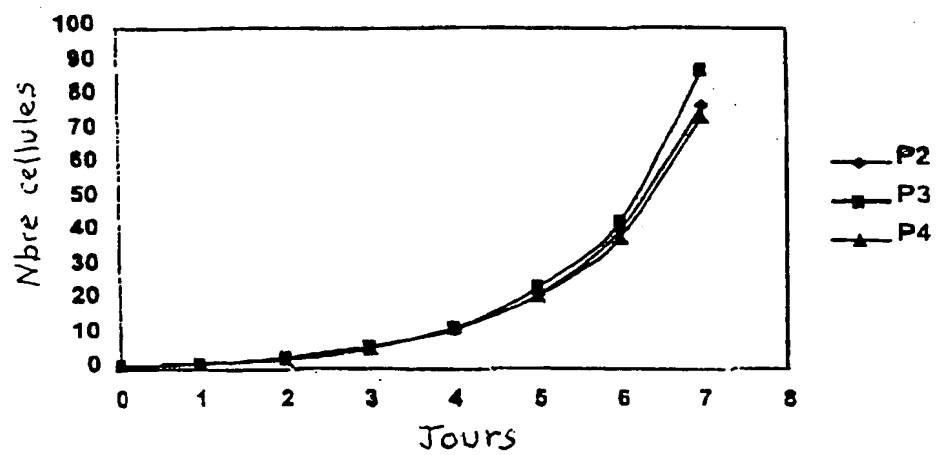


Figure 12

8/8



Figure 13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR00/02802

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: A61K35/32 C12N5/08 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 197 51 575 A (RAPP HANS DR DR) 27 May 1999 (27.05.99)	1-8 14-17 23, 24
A	The whole document	
X	BERNARD-BEAUBOIS K ET AL: "Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes." CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY, Vol. 13, no. 2, pages 103-113, XP000900541 Page 104, "Materials and methods"	25
A	US 5 942 496 A (BONADIO JEFFREY ET AL) 24 August 1999 (24.08.99) column 19, line 15 – line 23 example XI	9, 10, 18, 19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
16 November 2000 (16.11.00)

Date of mailing of the international search report  
9 February 2001 (09.02.01)

Name and mailing address of the

European Patent Office

Authorised officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/02802

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAO Y ET AL : « Generation of neo-tendon using sythetic polymers seeded with tenocytes » TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, Vol. 26, no. 6, December 1994 (12.94), Pages 3390-3392, XP000960761 Cited in the application The whole document	14-19, 23, 24
P, A	--- MÖLLER H D ET AL. : « Aktuelle Aspekte der Sehnenheilung » DER ORTHOPÄDE, Vol. 29, no. 3, March 2000 (03.00), pages 182-187, XP000900748 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02802

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10, 14-19, 23-25

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The administration responsible of the international research has found that many (groups of) inventions in the international request, namely:

1. claims: 1-10, 14-19, 23-25

Composition of the tenocytes ; utilisation of the tenocytes for the preparation of a composition for implantation ; tenocytes culture process.

2. claims: 12, 13, 26; 25 (partially)

Composition for the conservation (freezing) of tenocytes;  
Its utilisation for the preparation of a frozen tenocytes composition: frozen tenocytes composition.

3. claims: 11, 20-22, 27; 25(partially)

Processes and compositions for the tenocytes genetic of modification; tenocyte genetically modified,



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/ FR 00/02802

Patent document Cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19751575 A	27-05-1999	NONE	
US 5942496 A	24-08-1999	US 5763416 A	09-06-1998
		AT 186327 T	15-11-1999
		AU 698906 B	12-11-1998
		AU 1968695 A	04-09-1995
		CA 2183542 A	24-08-1995
		DE 69513149 D	09-12-1999
		DE 69513149 T	21-06-2000
		DK 741785 T	10-04-2000
		EP 0741785 A	13-11-1996
		ES 2139889 T	16-02-2000
		JP 3054634 B	19-06-2000
		JP 9509825 T	07-10-1997
		WO 9522611 A	24-08-1995
		US 6074840 A	13-06-2000
		US 5962427 A	05-10-1999

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9

PCT/FR 00/02802

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K35/32 C12N5/08 C12N5/10 A61K48/00

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

C1B 7 C12N A61K

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

X	DE 197 51 575 A (RAPP HANS DR DR) 27 mai 1999 (1999-05-27)	1-8, 14-17, 23,24
A	le document en entier ---	
X	BERNARD-BEAUBOIS K ET AL: "Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes." CELL BIOLOGY AND TOXICOLOGY, vol. 13, no. 2, 1997, pages 103-113, XP000900541 page 104, "Materials and methods" ---	25
A	US 5 942 496 A (BONADIO JEFFREY ET AL) 24 août 1999 (1999-08-24) colonne 19, ligne 15 - ligne 23 exemple XI ---	9,10,18, 19
	---	
	-/--	

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09 07 2001

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02802

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CAO Y ET AL: "Generation of neo-tendon using sythetic polymers seeded with tenocytes" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 26, no. 6, décembre 1994 (1994-12), pages 3390-3392, XP000960761 cité dans la demande le document en entier	14-19, 23,24
P,A	----- MÖLLER H D ET AL.: "Aktuelle Aspekte der Sehnenheilung" DER ORTHOPÄDE, vol. 29, no. 3, mars 2000 (2000-03), pages 182-187, XP000900748 -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 00/02802

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup> 1-10, 14-19, 23-25

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-10, 14-19, 23-25

Composition de ténocytes; utilisation de ténocytes pour la préparation d'une composition pour implantation; procédé de culture de ténocytes.

2. revendications: 12, 13, 26; 25 (partiellement)

Composition pour la conservation (congélation) de ténocytes; son utilisation pour la préparation d'une composition de ténocytes congelés; composition de ténocytes congelés.

3. revendications: 11, 20-22, 27; 25 (partiellement)

Procédés et compositions pour la modification génétique de ténocytes; ténocyte génétiquement modifié,

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02802

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 19751575 A	27-05-1999	AUCUN	
US 5942496 A	24-08-1999	US 5763416 A	09-06-1998
		AT 186327 T	15-11-1999
		AU 698906 B	12-11-1998
		AU 1968695 A	04-09-1995
		CA 2183542 A	24-08-1995
		DE 69513149 D	09-12-1999
		DE 69513149 T	21-06-2000
		DK 741785 T	10-04-2000
		EP 0741785 A	13-11-1996
		ES 2139889 T	16-02-2000
		JP 3054634 B	19-06-2000
		JP 9509825 T	07-10-1997
		WO 9522611 A	24-08-1995
		US 6074840 A	13-06-2000
		US 5962427 A	05-10-1999

**(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED IN ACCORDANCE WITH THE PATENT COOPERATION  
TREATY (PCT)**

**(19) World intellectual property organisation**  
International Bureau

<b>(43) International publication date</b>	<b>(10) International publication number</b>
19 April 2001 (19.04.2001)	WO 01/26667 A1

**(51) International patent classification<sup>7</sup>:**  
A61K 35/32, C12N 5/08, 5/10, A61K 48/00

**(21) International application number:**  
PCT/FR00/02802

**(22) International filing date:**  
10 October 2000 (10.10.2000)

**(25) Language of submission:** French

**(26) Language of publication:** French

**(30) Data on priority:**  
99/12711      12 October 1999 (12.10.1999)

**(71) Applicant:** *(for all designated states with the exception of US):*  
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, F-75252 Paris  
05 (FR).

**(72) Inventor; and**

**(75) Inventor/Applicant** *(for US only):* SAILLANT, Gérard [FR/FR]; 8, sente des Bruyères, F-78170 La Celle Saint Cloud (FR). KLATZMANN, David [FR/FR]; 11, rue du Tage, F-75013 Paris (FR). SALZMANN, Jean-Loup [FR-FR]; 70, rue Claude Bernard, F-75005 Paris (FR).

THIS PAGE LEFT BLANK



**BOGGIONE, Christophe** [FR/FR]; 157, rue de Grenelle, F-75007 Paris (FR). **BOYER, Olivier** [FR/FR]; 100 bis, rue Ordener, F-75018 Paris (FR). **JAYANKURA, Marc** [BE/BE]; Dries 26-28, B1170 Bruxelles (BE).

(74) **Attorney: BECKER, Philippe**; Cabinet Becker et Associés, 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).

(81) **Designated states (national)**: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated states (regional)**: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**

- *with international search report*
- *with amended claims*

*Reference is made regarding the declaration of the two letter-code and other abbreviations to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette*

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

## TENOCYTE COMPOSITIONS, THEIR PREPARATION AND USES

The present invention relates to tenocyte cell compositions, particularly human tenocyte cell compositions and to methods for their preparation. It also relates to the use of these compositions for implantation of tenocytes *in vivo* for the treatment of different pathological conditions. The invention is more particularly related to the production of suspensions of human tenocytes, particularly autogenous tenocytes, to techniques for their conservation, to their genetic modification *ex vivo* or *in vivo*, and to their use *in vivo* for the restoration of affected ligamentous or tendinous structures or, more generally, for the treatment and repair of any significant clinical defects in tendons, ligaments, muscles or other biological tissues that contain tenocytes or a fibrous structure.

The tendon is substantially composed of collagen fibres to 30%, and of elastin fibres to 2%, that are enclosed within an extra-cellular matrix that comprises water to 68%.

The different components of a tendon are:

- Collagen fibres of type 1: which constitute the major component at 70% of the dry weight of the tendon. Their arrangement, parallel to their mechanical constraints, is responsible in the tendon for resisting forces of traction.
- The elastin fibres provide the elasticity of the tendon
- The extra-cellular matrix is composed of proteo-glycans, glyco-proteins and water; and
- A minor cellular component, principally represented by the tenocytes (fibroblasts, differentiated into tendons, apo-nervous tissue and ligaments).

A tendon is organised into structures of increasing dimension:

- Collagen fibres: the basic unit of collagen comprises the tropo-collagen. This consists of a long protein of 200 nm by 1.5 nm, mainly of the type 1, formed by an assembly of 3 alpha chains rolled into a triple helix. The tropo-collagen is derived from the polymerisation of pro-collagen molecules secreted by the tenocytes. The assembly of 5 units of tropo-collagen constitutes a fibril of

THIS PAGE LEFT BLANK

collagen. A number of parallel fibrils, enclosed within the extra-cellular matrix, comprise a collagen fibre (Fig. 1).

- A collagen bundle: The collagen fibres associate to form bundles within the axis of the tendon. The bundles are separated by loose connective tissue, the endo-tendon, which contains the vasculo-neural elements and promotes sliding of the bundles between each other (Fig. 2).
- The tendon itself: The combination of bundles, both primary and secondary, constitutes the tendon enclosed within a connective tissue membrane, the epi-tendon (or peritenonium).

Around the tendon are associated structures that comprise the para-tendon, a loose connective tissue that provides support for the tendon, or fibrous and synovial sheaths that provides support for and promotes sliding of the tendon. The synovial sheath is formed by two laminae that provide a space for the sliding action.

The vascularisation of the tendon is provided principally at its extremities. It is derived from the muscular and peri-osteal arterioles. There is also a vascular supply arising from the meso-tendon or from the para-tendon, but this is of less importance. In addition, the middle third of the tendon that is poorly vascularised, comprises a critical section of the vascular system, that could explain its particular mechanical fragility.

The tendon, in all respects like the ligaments, is a relatively fragile tissue, that is subjected to multiple alterations, be they of a traumatic nature or associated with ageing.

Thus, the structure of the tendon becomes modified physiologically with age, which can explain the developing fragility that is observed during the ageing process (1). The fragilisation characteristics of the tendons are a reduction in the number of tenocytes, a reduction in the number of elastic fibres, a reduction in the quality and thus in quantity of the collagen fibres, as well as a reduction in the number of proteoglycans and, as a consequence, also in the level of hydration.

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

Among the exogenous factors that aggravate the fragilisation of the tendons, have been noted the repeated micro-traumatism (micro-ruptures that appear when the tendon is stretched beyond 4%), the dominance of androgens (through an increase in proximation between the musculature and the tendon), and the dominance of corticosteroids (due to the reduction in fibroblast activity). The reduction, absolute or relative, in the number of tenocytes, as well as in their metabolic possibilities, leads to a limitation of tendon regeneration. The weak vascularisation of the tendon reinforces this phenomenon.

Apart from the alterations to tendons and ligaments, a slow natural healing process occurs that can be schematically classified into four phases.

A first inflammation phase (72 hours) that is characterised by the retraction of the tendon banks, the formation of a haematoma in the inter-fragmentary space, the coagulation and liberation of cytokines (histamine, serotonin, prostaglandins, bradykinin), which initiate the inflammatory phase. Following upon this, the cellular phase is marked by an increase in the number of macrophages and then by a proliferation of tenocytes (differentiation of cells derived from the paratendon). This then leads to the synthesis of collagen type III (immature) that has weak mechanical strength.

A second phase, the proliferation of cells (6 weeks), is characterised by the development of blood clots (the appearance of neo-vascular tissue, macrophagic degradation and re-incursion of fibroblasts), by an increase in the number of tenocytes that are synthesising collagen type I (mature), that become orientated by the constraining forces and by an increase in the number of proto-glycans. The mechanical properties become satisfactory at J45.

Third and fourth phases of the re-structuring and maturation of the scarred zone, are characterised by a progressive reduction in the cellular density of the tendon, by an increase in the density of the collagen of type I that is correctly orientated, by a decrease in the scar volume and by an increase in mechanical resistance.

THIS PAGE LEFT BLANK



Return to a structure resembling the normal state necessitates a delay of about one year. This scarring mechanism is, therefore, very slow, often aggravated by movement of the tendons and/or the ligaments, and frequently leads to the formation of weakened structures, because of having a fibrous composition with a different cellular structure from that of the original tissue.

In the particular case of scar tissue after completion of an auto-graft, it is observed at an early stage that the disappearance of the fibroblasts of the transplant and the macrophagic resorption of the transplant lead to its fragilisation. This is followed by the appearance of a hyper-vascularisation phase with neo-vessels followed by the re-appearance of tenocytes. Finally, a re-modelling phase is reached characterised by the synthesis of extra-cellular matrix and of collagen type I, which promote an increase in mechanical strength. Finally, the neo-tendon develops a structure approaching that of the original tendon through the effects of mechanical pressure. This transformation constitutes the ligamentisation phase that stretches over a period of about two years (2).

The current therapeutic interventions for the treatment of tendon changes that originate from trauma or are related to the ageing process, are:

- The directional healing of the tendon that favours a reduction in activity or even immobilisation;
- Repair of the tendon by direct suture, if necessary, reinforced with a synthetic material (re-absorbable or not re-absorbable bio-material);
- Replacement of the tendon by a transplant of a biological tissue (autologic or allogenic) or with a synthetic substitute.

In the first case, the result often leads to incomplete healing that comprises fibrous sequellae. In the latter two cases, a multiplicity of problems of bio-mechanical compatibility can occur that, in the long run, (3, 4) compromise the results. Moreover, cellular weakness and deficiency of the vascularisation limit the tendon regeneration process.

THIS PAGE LEFT BLANK

The present invention currently proposes a new therapeutic approach to the restoration of tendon damage or of other biological tissue structures containing tenocytes or fibrous or connective tissue types. The present invention is particularly based on the use of compositions and methods that promote an increase in the cellular content of a tendon and/or in its vascularisation. The present invention is based particularly on the implantation of tenocytes *in vivo* or on compounds that promote an increase in the number of tenocytes present in the biological, tissues *in vivo*, in such a way as to re-colonise and re-constitute the defective structure.

The present invention proposes in general to use tenocytes for therapeutic applications for the re-constitution of tissues, particularly in man. The invention particularly proposes the utilisation of human tenocytes, particularly autologues that are multiplied *in vitro*, as the medication that has the capacity to act in the re-constitution of biological tissues, particularly fibrous and connective biological tissues. According to a preferred application, the tenocytes, according to the invention, are used for the re-constitution of damaged tendons or ligaments such as, for example, with tendonitis, or when torn or sprained, etc. This application is particularly advantageous since, on the contrary, it promotes procedures for the current treatment of the re-generation of tissues having mechanical and physiological properties that approach those or are similar to those of natural tissues.

The present invention also describes methods that provide for the *in vitro* production and multiplication of tenocytes, that start out with the withdrawal of biological tissues, particularly of fragments of healthy tendons or ligaments.

The present invention discloses, amongst other things, that it is possible to implant tenocytes *in vivo*, that have been cultivated *in vitro* and, if the case arises, after their genetic modification, and that these implanted tenocytes are viable, functional and capable of providing a recombinant product. In this connection, in general, the invention relates to any therapeutic method that includes the implantation of genetically modified cells, for example of tenocytes or fibroblasts, into a tendon or a ligament.

THIS PAGE LEFT BLANK

The invention also discloses that it is possible to transfer recombinant nucleic acids *in vivo* into tenocytes so that they can provide biological products of interest.

Consequently, the present invention describes, in a general manner, therapeutic methods for the re-constitution of tendons, ligaments and other fibrous tissues, that are based on the implantation of tenocytes or on the modification of tenocytes *in situ*, particularly in man.

The present invention is described in detail in the following text. In order better to understand the present invention, the following definitions are provided:

**Tenocyte:** within the meaning used throughout the present invention, the term "tenocyte" refers to those cells comprising the cellular matter of tendons, ligaments or apo-nerves, for example or other fibrous tissues. Although the tenocytes of tendons, ligaments or apo-nerves are able to demonstrate sound characteristics, by which is meant fusiform cells having defined nuclei, originating from fibroblastic tissue. In addition, these cells are capable of producing collagen, elastin and extra-cellular matrix. The term tenocyte, within the meaning of the invention, refers equally to primary cultures and secondary cultures (obtained through multiplication *in vitro*) or to established derivatives.

**Fibroblast:** A fusiform cell of connective tissue that is capable of synthesising the proteins of the extra-cellular matrix.

**Recombinant nucleic acid:** The term re-combinant nucleic acid describes all nucleic acids encoding a product of interest, which refers to an RNA or a polypeptide (which term is a general designation of all proteins, fragments of proteins or peptides). It refers more preferably to a poly-peptide having biological activity, particularly having a growth factor. The recombinant nucleic acid can be a DNcA, a DNgA, a synthetic or semi-synthetic DNA, an oligo-nucleotide, an RNA, etc. It can refer to a nucleic acid of human, plant, viral, pro-caryote, or artificial, etc. origin. The recombinant nucleic acid can, moreover, comprise regulating transcription sequences, such as, for example, promoters, terminators, enhancers, secretion sequences, etc. In addition, the recombinant nucleic acid can be in linear-, circular-, simple-brin- or double-brin form. It can form part of a plasmid, cosmid, phage, artificial chromosome, virus, etc.

THIS PAGE LEFT BLANK

**Naked DNA:** This is a compound comprising a recombinant nucleic acid that lacks an agent that facilitates transfection, including a virus. It typically refers to a nucleic acid fragment or to a plasmid, in saline solution and/or in a glucose solution (for example, a 5% glucose solution).

**A genetically modified cell:** All cells that contain a recombinant nucleic acid such as one defined above. It can refer to a cell in which the recombinant DNA has been introduced, or to a derivative of such a cell.

A primary object of the present invention is, more particularly, to provide a composition that contains human tenocytes, autologues and/or allogenic. It advantageously refers to a composition that substantially contains human tenocytes, that is to say preferably that of which more than 60% of the cells are human tenocytes. Typically, a tenocyte composition according to the invention, has at least 80% of cells of the tenocyte type. The composition can, in addition, comprise other types of cells (fibroblasts, endothelial cells, etc.), or other biological factors. The compositions can be in solution or frozen, as will be explained in the following text. When it refers to solutions (or suspensions), the compositions can be in a culture medium, a preservation medium and/or as an injection. Moreover, the cellular compositions according to the invention can be contained within any appropriate system (or container) such as, for example, an ampoule, syringe, phial, pocket, box, etc.

Another particular object of the invention is a composition that contains autologous and/or allogenic equine tenocytes. As will be explained in the following text, such compositions are particularly advantageous for the treatment of ailments of equine tendons and/or ligaments.

A further object of the invention is the provision of a culture *in vitro* or *ex vivo* of human or equine tenocytes, particularly autologous and/or allogenic human tenocytes. These can refer to primary or multiple tenocytes *in vitro* or *ex vivo*, and, as the case may be, obtained from a previously established bank. The cultures advantageously comprise a medium that is adapted to a culture or to the multiplication of cells.

THIS PAGE LEFT BLANK



The invention also provides a method for the preparation of tenocytes, particularly of human tenocytes, that comprises the removal of a fragment of biological tissue that contains tenocytes, the treatment of this fragment for the separation of the tenocytes, and the establishment of a culture of the tenocytes.

According to a preferred method for the operation, the fragment of biological tissue is derived from healthy tissue. More preferably, it concerns a small fragment of tissue, having, for example, a weight of less than or equal to 10 g, preferably less than or equal to 1 g, more generally having a weight between 0.5 and 5 g. The present invention demonstrates, in effect, that, starting from samples of limited size and that have a low content of tenocyte cells, it is possible to isolate these cells and to multiply them *in vitro*.

Taking into account the poor cellularity of the tendon and the necessity for extracting an explant that is as small as possible, in view of its application in a situation where there is a restricted amount of damaged tendon material, the present invention describes the possibility of and the conditions for obtaining the tenocytes starting from such small tendon explants. The extraction of tenocytes from a fragment of tendon weighing 150 mg (the patellar tendon of the rabbit) has allowed for the provision of a quantity of tenocytes of the order of  $10^6$  elements over a period of 21 days. The growth rate is subsequently exponential, with the time taken for doubling seeming to diminish with the number of passages. In this case, the invention also demonstrates that a significant multiplication (expansion) of the tenocytes in the culture can be obtained from several successive passages, when the cells are seeded with about 25% of the assembly. This characteristic constitutes the preferred procedural method for the preparation according to the present invention. The digestion of a patellar tendon weighing 0.5 g has allowed for the production of  $7 \times 10^5$  cells in 24 hours. By extrapolation, these results indicate that from about 1 g of human tendon, it is possible to produce  $10^7$  to  $10^8$  cells over about 2 weeks.

These results also show that the tenocytes multiplied *in vitro* retain their capacity for reconstitution of the tendon when they are re-implanted *in vivo*.

THE PAGE LEFT BLANK

The extraction of the sample of tissue can be achieved in a number of different ways such as, for example, by micro-dissection, micro-laceration, during a fine search procedure, with an intra-tendon- or intra-ligament extraction, or by withdrawal of a fragment of apo-nervous tissue, etc. The fragment of biological tissue can also be obtained, for example, from a bank.

Preferably, the fragment of biological tissue is a fragment of tendon, of ligament or of apo-nervous tissue. The present invention, therefore, relates to compositions of tenocytes obtained (and/or derived) from tendon, ligament or apo-nervous tissue. The fragment (containing the tenocytes) can be extracted by surgical or micro-surgical techniques. In this connection, it is also possible to establish a tenocyte bank, for example by way of all tendon or ligament tissue removed from a subject (human or animal). These banks can be preserved and subsequently treated prior to their utilisation. These banks allow for the production at any time, of a significant number of tenocytes such as, for example, autologues, and to utilize such cells rapidly, without having the need for pre-extraction, dissociation and/or culture procedures, when an intervention becomes necessary. Therefore, the invention also concerns a procedure for the preparation of a bank of tenocytes, which comprises the acquisition of tenocytes from biological tissue, their multiplication *in vitro* and their preservation, and, if the case arises, after verification of the characteristics of sterility, absence of contamination, purity, etc. It can comprise banks of human or animal, particularly equine tenocytes. These banks can, advantageously, be prepared in a preventative manner for subjects where there are risks of development of lesions in ligaments, tendons or muscles in the case, for example, of sports persons. Such banks can be preserved in a frozen form under the conditions described below.

Preferably, human tenocytes are prepared, according to the invention, by starting with the Achilles tendon or the following tendons:

- Goosefoot tendon: Right internal muscles (M. Gracilis) and the demi-tendinosus (M. semitendinosus). These tendons are practically unused by human beings and can be completely extracted. They can allow for obtaining around  $10^6$  to  $10^7$  cells by the *in vitro* culture according to the invention.

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

- Tendon to the small plantar muscle (M.Palmaris longus). This tendon also can be extracted whole. It is therefore possible to obtain a volume of tissue of the order of about 1 to 3 grams.
- Tendon to the thin plantar muscle (M.plantar). This tendon can also be extracted whole. Thus, it is possible to obtain a volume of tissue of the order of about 2 to 4 g.
- Tendon to the anterior fibular muscle (M.peronus tertius). This tendon can also be extracted whole. Thus, it is possible to obtain a volume of tissue of the order of about 2 to 3 g.
- Tendon quadricipital. From this tendon, it is possible to extract a fragment of tissue of a volume of the order of 1 g, without affecting its performance or risk of making it fragile.
- Patellar tendon (Lig. patellae). From this tendon, it is possible to extract a fragment of tissue of a volume of the order of 1 g, without affecting its performance or risk of making it fragile.

Tenocytes can also be obtained from the following ligaments:

- Ligament acromio-coracoidal (Lig. Coraco-acromialis)
- Ligament lateral interior of the knee (Lig. Collateral-tibialis)

Or they can be extracted from apo-nerves such as:

- Femoral apo-nerve (Fascia lata)
- Apo-nerves of the gastrocnemius muscles (M.gastrocnemii).

Preferably, human tenocytes, according to the invention, are obtained (or derived) from a tendon. The tenocytes prepared in this way should, in effect, have useful mechanical and physiological properties.

THIS PAGE LEFT BLANK

Preferably, the tissue fragment is treated by:

- Mechanical comminution and/or
- Enzymatic digestion, for example in the presence of enzyme(s) that is/are capable of hydrolysing the collagen molecules.

The mechanical comminution promotes and/or accelerates the dissociation of the cells present in the fragment. This mechanical treatment can be carried out with the use of scissors, pincers, scalpels, lancets, sieving through grills, etc. Preferably, the mechanical treatment is continued until a tissue preparation is obtained that is composed of fragments whose size is less than about 20 mm<sup>3</sup>, and preferably less than 10 mm<sup>3</sup>.

The biological sample is then subjected to a treatment in the presence of a composition comprising at least one enzyme that is capable of hydrolysing the collagen, preferably collagen of the type I or, more generally, that is capable of degrading one or several components of the extra-cellular matrix of the tendon (composed principally of collagen of type I, in association with proteoglycans).

A preferred enzyme used in this stage is collagenase. The collagenase used is preferably of bacterial origin such as, for example, collagenase D, collagenase A, collagenase P, the collagenase of *Vibrio alginolyticus* (EP 430635), or also collagenase CoH from *Clostridium histolyticus* (J.Bact. 181 (1999) 2816). Other collagenases can also be used such as, for example, collagenases of eucaryote origin, particularly mammalian, for example human. In particular, it is possible to utilise collagenases (recombinants) from mammals, specifically collagen of the type I and/or from a tendon, or also modified collagenases, for example, by directed mutagenesis, which possess the improved properties in terms of their usefulness, their selectivity, their activity conditions, etc. In particular, collagenases can be used that are modified (for example, by directed mutagenesis), that are capable of exercising activity at low temperatures, particularly such that are below 20°C, more preferably below 10°C.

THIS PAGE LEFT BLANK



According to a particular method, a recombinant collagenase is used, that is a product of cellular host activity. The use of a recombinant collagenase provides advantages over that of natural collagenases (absence of contaminants, usefulness, etc.).

The dissociation stage is generally carried out at a temperature close to that of the human body, for example between 32 and 40°C, preferably close to 37°C, over a period that is adaptable by the technical expert to a function of the quantity of enzyme used (from 0.05 to 5 mg/ml, more preferably between about 0.1 to 1 mg/ml). A typical dissociation stage, according to the invention comprises bringing the biological sample (if necessary, treated mechanically as described above) into contact with the collagenase (0.5 mg/ml) over a period of about 15 hours at 37°C with stirring. For the dissociation stage, the collagenase can in all cases be used in combination with other enzymes, recombinant or extracted, the quality of which must be controlled.

More precisely, the present invention relates to a process for the production of tenocytes, and comprises:

- Extraction of a fragment of biological tissue that contains tenocytes, preferably of human origin,
- Treatment of the fragment to dissociate the tenocytes, in the presence of a collagenase, and
- Subjecting the tenocytes to a culture procedure and multiplying these in vitro by successive passages, preferably by seeding at a density corresponding to about a quarter of the assembly.

The tenocytes obtained can be preserved in a variety of different culture media (Ham, RPMI, DMEM, etc.) and/or preservation media (saline solutions, etc) with a view to their utilisation as needed, or can be stored, for example, as a tenocyte bank as indicated above.

In this connection, the present invention also describes the compositions and methods that are particularly useful for the preservation of tenocytes, particularly in the frozen state. These methods advantageously allow the tenocytes to be preserved for long

THIS PAGE LEFT BLANK

periods without affecting their functional properties. In addition, the compounds and methods that are used for particular purposes are compatible for therapeutic use, and, therefore, allow the tenocytes or compositions of tenocytes that are destined for *in vivo* implantation, to be preserved.

The freezing can be carried out under different conditions and in the presence of different agents or protection compounds.

According to a first variation for carrying out the freezing procedure, this is undertaken in the presence of dimethyl sulphoxide (DMSO). The DMSO is a well-known protection agent which penetrates the cellular membranes and renders them with protection such that the cells are prevented from being destroyed. A typical medium for the freezing procedure with DMSO is, for example, to use 5 to 25% of DMSO and foetal calf serum. This type of medium is illustrated in the examples and provides useful protection for the tenocytes, without loss of activity.

The freezing procedure can equally be undertaken in the absence of DMSO, particularly in a medium comprising serum albumin (human), a saline solution and a modified gelatine. This kind of composition has been described in Application FR 2,746,109. According to another preferred method for carrying out the freezing procedure, this is undertaken in a medium comprising human albumin, a polysaccharide and, possibly, a saline solution.

A particular object of the present invention is, therefore, a composition comprising tenocytes, particularly human tenocytes, in a frozen condition. The invention also describes the medium required for the preservation of tenocytes, particularly human tenocytes, which comprises the tenocytes, particularly human ones, and:

- DMSO, or
- A modified gelatine, or
- A polysaccharide, or
- Glycerine

The person skilled in the art can, moreover, use the process described below for adapting the composition of the freezing medium, particularly for the identification of

THIS PAGE LEFT BLANK

other compositions that can be used for the preservation of tenocytes in a frozen state.

Preferably, this describes a medium comprising tenocytes, a saline solution, human albumin and a modified gelatine or a polysaccharide, preferably a polysaccharide. Even more preferable, is for these compositions, according to the invention, to comprise at least  $5 \times 10^5$  of tenocytes/ml.

The preservation medium of the invention is generally prepared by mixing different components together, then adding the said medium to the tenocytes. As indicated above, the tenocytes can be primary tenocytes that have been freshly isolated from a biological sample, or also tenocytes that have been multiplied in vitro (for example, by single-bed culture).

For the freezing of the tenocytes, the saline solution used can, more particularly, be an isotonic solution with the plasma. The salts that penetrate the composition of this solution can vary. Advantageously, they comprise chlorides such as, for example, sodium chloride, potassium chloride calcium chloride and/or magnesium chloride, and lactates such as, for example, sodium lactate. In a typical example, the isotonic saline solution comprises sodium chloride, potassium chloride, magnesium chloride and sodium lactate. According to another variation, the magnesium chloride is replaced by calcium chloride. In this case, the concentrations of salts in the saline solution are equivalent or more or less equivalent to those in a "Ringer-lactate" solution. Such a solution is normally used as an infusion to compensate for any dehydration or, for example, for any loss of physiological fluid.

According to a special procedure for carrying out the process of the invention, the saline solution is substantially composed of NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl and lactate in concentration ranges, respectively, of 2 to 9 g/l; 0.05 to 0.2 g/l; 0.05 to 0.5 g/l and 0.5 to 5 g/l.

The derivatives of gelatine used for the preservation of the tenocytes are, more particularly, modified liquid gelatines. Such modified liquid gelatines according to the invention are typically constituted from hydrolysis products of chemically modified

THIS PAGE LEFT BLANK

collagen, that are compatible for pharmaceutical use. These are preferably products having an average molecular weight within the range of 10 kD to 100 kD, and still more preferably between 15 kD and 40 kD. They are preferably modified by reaction with an anhydride so as to provide a final product that has a liquidity adapted for research use in accordance, for example, with the teaching in Patent FR 1,291,502. It refers, preferably, to succinic anhydride or to citraconic-, itaconic-, aconitic- or maleic anhydride. A modified liquid gelatine that is particularly advantageous is constituted from the hydrolysis product of collagen having an average molecular weight of between 15 kD and 40kD, that is modified by reaction with succinic anhydride. The modified liquid gelatines can, in accordance with the invention, be prepared by techniques known to the person skilled in the art. Amongst the modified liquid gelatines used, reference can be made by way of example to oxy-polygelatine, that is obtained by the polymerisation of gelatine with glyoxal and oxidation with  $H_2O_2$ . Other modified liquid gelatines are obtained by reaction of gelatine (that preferably has a range of molecular weights between about 15,000 to 36,000) with succinic anhydride, or with citraconic-, itaconic-, aconitic- or maleic anhydride, or with succinyl- or fumaryl chloride, as is described in French patent no. FR 1,291,502. All these derivatives of gelatine are compatible with their pharmaceutical use and can be directly introduced in isotonic saline solution into the blood stream. The modified liquid gelatines have also been described in patents US 2,525,753, US 2,827,419 and US 3,108,995.

The serum albumin used is a human serum albumin (HAS), obtained as an extract or as a recombinant. The natural extract of HAS can be produced by the purification of biological material of human origin, by classical techniques of fractionation of plasma derived from blood donations (Cohn et al., J.Am.Chem.Soc. 68 (1946) 459 pp), or by extraction from the human placenta in accordance with the technique described by J.Liautaud et al. (13<sup>th</sup> International Congress on ABS, Budapest; A: "purification of proteins. Development of Biological Standard", Karger (ed), Bale, 27 (1973) 107 pp). Preferably, the purified albumin used within the context of the present invention is a plasmatic albumin. Most particularly, a commercial solution of plasmatic albumin can be used. The recombinant HAS can be produced in a variety of host cell types, preferably in a eucaryote (cf. FR 2.746,109).

THIS PAGE LEFT BLANK



For the preservation procedure, the polysaccharide used can have different structures and different molecular weights. Preferably, a polysaccharide sulphate is used that preferably has a molecular weight between 5,000 and 500,000 daltons, more preferably between 30,000 and 250,000 daltons. The polysaccharide can be selected, for example, from dextran (40,000 or 60,000 daltons), amidone, hydroxy-ethylamidone (240,000 daltons), etc.

In a particular method of operation, the medium of the invention is composed of plasmion (FR 2,042,381) to which is added human serum albumin to variable concentrations.

In another preferred method of operation, the medium of the invention is composed of Rheomacrodex®, Hemodex®, Plasmaclair® or Hesteril®, to which human serum albumin is added to variable concentrations (from 5% to 45% for a 20% albumin solution).

If necessary, the respective concentrations of the different constituents can be adjusted with the use of the following methodology:

Into each pit on multi-pit plates, each of the constituents of the medium is introduced at a fixed concentration with the exception of a constituent whose concentration is variable. If necessary, a number of plates are prepared to allow for simultaneous testing of the different conditions of concentration for each constituent, or, if the number of pits is sufficient, the different conditions are tested on the same plate. Preferably, each condition is tested on each plate at least twice, preferably three times. A preparation of tenocytes is then introduced onto each pit at a concentration of the order of  $10^6$  cells/ml. The plate is placed into liquid nitrogen at  $-80^{\circ}\text{C}$  (if necessary, after an intermediary stage in the freezer). The frozen plates are then unfrozen, and the cellular viability is determined for the contents of each pit, for example by staining with trypan blue. Each plate can be assessed by an automated system in such a way as to allow for evaluation of many conditions and for the simple analysis of the results obtained.

THIS PAGE LEFT BLANK

The compositions of tenocytes according to the invention can be preserved in a frozen state, for example at  $-80^{\circ}\text{C}$ , without significantly affecting the functional properties of the cells. As indicated in the examples, a viability of the cells in excess of 85% is achieved.

The present invention demonstrates, moreover, that the tenocytes can be modified genetically *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*, to contain a recombinant nucleic acid. This aspect of the present invention, therefore, allows for the transfer of biological properties and particular functionalities to the tenocytes, *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*, thereby, for example, improving the therapeutic capacity of the cells.

Another object of the invention is, thus, to provide for a human, genetically modified tenocyte, that is to say, one that contains a recombinant nucleic acid.

Another object of the invention is, thus, to provide for an equine, genetically modified tenocyte, that is to say, one that contains a recombinant nucleic acid.

The present invention also relates to any genetically modified tenocyte (i.e. of human or animal origin, for example equine), characterised in that it contains a recombinant nucleic acid that is coded for the growth factor or a factor that inhibits an inflammatory reaction. Such tenocytes exhibit advantageous properties for the reconstitution of biological tissue. The nucleic acid can have been introduced into the cell itself or into its parent cell, by different techniques for gene transfer (via a viral or non-viral vector, naked DNA, bombardment, electronic methods, etc).

In this connection, the present invention also describes particularly useful methods for transferring genes into tenocytes *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*. These techniques rest principally on the use of naked DNA, of DNA that is combined with a promoting agent (for example, a cationic polymer) or, further, with the use of a recombinant retrovirus of the type GALV or a pseudo-type thereof enclosed by GALV.

The invention particularly relates to all non-viral methods for transferring a recombinant nucleic acid into a tenocyte, human or animal, that comprises the placing

THIS PAGE LEFT BLANK

of a tenocyte *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*, into contact with a recombinant nucleic acid. Such non-viral methods can, according to the present invention, comprise, for example,

- a direct contact in the form of naked DNA;
- a contact in the presence of an agent or agents that can promote the transfection, for example the cationic polymers (poly-ethylene-imine), cationic lipids or peptides;
- bombardment, or also
- the application of an electric field.

A particularly preferred method is in the utilisation of naked DNA. Thus, a particular object of the invention is to provide a method for transferring genes into a tenocyte, which comprises bringing a tenocyte *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*, into contact with a naked recombinant nucleic acid.

The invention also comprises the utilisation of:

- a composition comprising naked DNA for the preparation of a composition destined for transferring of this DNA into the tenocytes *in vivo*;
- a composition comprising a recombinant pseudo-typed retro-virus enclosed by GALV, for the preparation of a composition destined for the transfer of this DNA into the tenocytes *in vivo*;
- a recombinant nucleic acid for the preparation of a composition destined for the genetic modification of a human tenocyte *in vivo*.

The present invention also relates to the utilisation of tenocytes for the treatment of different pathologies or deficiencies, both in man and in animals (particularly the horse).

In addition, another object of the invention is the utilisation of tenocytes for the preparation of a composition destined for implantation *in vivo*.

THIS PAGE LEFT BLANK

In particular, the invention relates to the utilisation of tenocytes for the preparation of a composition destined for the initiation of a method for therapeutic treatment and diagnosis of, or surgical intervention on the human or animal body.

In the case of animals, particular mention is to be made of horses, particularly race-horses, that are subject to various alterations of the tendons or ligaments of the type of tendinitis. Such horses are either put down or treated by tendon splitting which, however, leads to greater rigidity of the tendons or to thickening so that the mechanical properties are impaired. The present invention allows for the implantation of analogous tenocytes (or of allogenic or xenogenic tenocytes), that are, for example, derived from a pre-established bank, for the reconstitution of tendons that will have mechanical properties similar to those that have not been affected.

The tenocytes used in these methods of treatment are preferably autologues, that is to say, they are obtained from the same subject that is to receive the implants. As indicated above, it refers generally to tenocytes that have been multiplied *in vitro*, perhaps genetically modified, for example for encoding a growth factor. In any case, it can also refer to allogenic tenocytes (i.e. such that have been derived from a subject of the same species) or to xenogenic tenocytes (i.e. from another species).

The present invention also describes methods for the restoration of defects in tissues *in vivo*, which comprise the administration of tenocytes to a subject, preferably autologues, for example such that have been multiplied *in vitro*. The cells can, additionally, be subjected to genetic modification. The administration can be undertaken in different ways. Preferably, it is done by peritendinous injection (into the sheath surrounding the tendon), or intra-tendinously (into the interior itself of the tendon, for example between the fibres). The injection can be undertaken percutaneously, during a micro-dissection procedure that, for example, allows section (separation) of the tendon, particularly during a splitting procedure.

Preferably, the dosage of cells injected is between  $10^4$  and  $10^9$ , more preferably between  $5 \times 10^5$  and  $5 \times 10^7$  cells per injection. A typical injection comprises  $10^6$  to

THIS PAGE LEFT BLANK



$10^7$  cells. Moreover, two successive injections can, if necessary, be carried out (see below). The precise quantity of cells and the number of injections can be adapted by the person skilled in the art depending on the subject, the severity, the localisation and/or the magnitude of the defect that is to be treated, and on the presence of genetically modified cells, etc. In particular, in the case of the regeneration of a muscular defect (for example, a torn muscle), a more substantial number of cells can be administered.

The use of tenocytes according to the invention, is particularly advantageous in orthopaedic surgery or for the repair of muscular lesions. In fact, tenocytes possess a metabolic activity for the important regeneration of tissues, that adapts to the local repair requirements. The utilisation of cells derived from anatomical structures that are close to the structures to be repaired comprises an additional, major advantage for reconstitution procedures of tissues that will have good mechanical properties. The use of tenocytes according to the invention, will also allow for a reduction in the time taken for the spontaneous healing process of fibrous structures (tendons, ligaments, etc.), which is frequently lengthy, (more than 45 days) and incomplete. To this end, compositions of tenocytes are preferably used, for the repair of lesions in tendons, that have been extracted (or derived) from tendons, and for the repair of lesions in ligaments compositions of tenocytes are used that have been extracted (or derived) from ligaments. The use of tenocytes that have been multiplied *in vitro* not only promotes an increase in cellular constituents of injured tissue, but equally serves as vector for the transfer of recombinant nucleic acids. In this connection, another advantage of the invention is the absence of any tenocyte migration out of the anatomical structure being treated. This substantially permits localisation of the effect, particularly during the transfer of genes *ex vivo* or *in vivo*. In addition, the fact that the delivery of the recombinant biological product becomes effective on contact with the effected cell itself, this favours intensification of the response. Thus, the chemotactism existing during the healing process also favours an attraction of tenocytes introduced and/or injected into the site of the lesion, thereby further promoting the local effect.

A further application of the techniques for increasing cellular production *in vitro* according to the invention, concerns the repair of traumatic muscular lesions. Thus, in

THIS PAGE LEFT BLANK

more or less extensive ruptures, conservation treatment is the general rule, but at a price of slow healing. In addition, the persistence of an accompanying muscular nodule is sometimes observed together with a loss of muscular power and the risk of blockage of the damaged area by fibrous scar tissue which also diminishes the mechanical quality of the repaired muscle. The injection, (for example, percutaneously) of a composition containing tenocytes (or myoblasts) will promote a rapid packing of the damaged area and preserve the mechanical qualities of the muscle.

Consequently, the invention also relates to the compositions and methods for:

- reconstituting the cellular composition of tendons, ligaments or muscles,
- promoting the healing of ligaments, tendons or muscles,
- treating defects in biological tissues such as, for example, defects in tendons, ligaments, skeletal muscles, etc., as well as
- the production of biological factors *in vivo* by the administration of tenocytes that have been genetically modified *ex vivo*, or by genetic modification of the tenocytes *in vivo*.

According to a particular method of the invention, the recombinant nucleic acid is coded with a growth factor and the invention allows for the production *in vivo* of a growth factor having the cellular composition of the tendon or of its vascularisation, with the aim of improving the regeneration of a tendon or ligament or, more generally, of biological connective tissue and/or fibrous or muscle tissue, (such as skeletal muscle), and/or of producing one or more factors that reduce inflammatory reactions.

By 'growth factor' is understood all proteins, polypeptides or peptides that are susceptible to promote specific biological responses such as, for example, chemotaxy, cellular proliferation, the synthesis of collagen fibres and of matrix proteins, induction of neo-vascularisation and the secretion of other growth factors.

Amongst the growth factors that can be utilized within the scope of the invention, the following can be cited:

THIS PAGE LEFT BLANK

- The TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), which seems to be a mediator implicated in the healing process of tendons because its presence is related to repair phenomena of tendons (5);
- The bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), which plays an important role in the proliferation of tenocytes and in angio-genesis (6). In fact, their receptors are active throughout the period of neo-vascularisation. The bFGF is produced by cellular inflammation, and also by tenocytes. This production is regulated by the healing environment.
- The EGF (Epidermal Growth Factor), which promotes the proliferation of tenocytes and where the receptors are present for a large part of the healing process. The constant activity of the receptors to the bFGF and the peak of the activity of the EGF receptors in the synovial membrane, indicate that the synovial is involved in the migration of tenocytes and in the re-vascularisation of a ligament lesion. The increase in receptors is also apparent at the level of the point of insertion of the ligament, an important vascularisation zone, thus promoting cellular migration by a chemotactic effect.
- The PDGF (Platelet Derived Growth Factor) which promotes mitogenic and chemotactic activity in the tenocytes. It also promotes the synthesis of collagen (7).
- The VEGF (Vascular Endothelial Cell Growth Factor) the action of which promotes an increase in vascularisation of the tendons or ligaments or muscles, and in this way facilitates the reconstitution of defective tissues.

The ideal period for administration of the genes bearing the growth factors, or of cells containing such genes, for the therapeutic interventions is, preferably during the 1<sup>st</sup> and the 7<sup>th</sup> day after the injury, which corresponds to the optimal activity period of the receptors. It is understood that the administration can be undertaken at different periods (particularly later).

These different growth factors and their specific receptors are, therefore, observed during successive phases of the healing process of ligaments and tendons. In many cases, the tissue repair is insufficient due perhaps to defects in the intrinsic healing process (for example, anterior ligament intersection), or to the existence of particular factors that reduce the capacity of the tissue to heal (ageing effect, retention of corticoids, diabetes, etc.). It has been shown that with anterior ligament intersection,

THIS PAGE LEFT BLANK

there is a shortage of mediators and of specific receptors. It is possible that this could also explain healing problems in tendon tissue.

Amongst the useful factors that inhibit inflammation reactions that can be used within the scope of the invention, there can be specifically mentioned interleucine-10, the receptor of interleucine-1, the corico-mimmetics or, more generally, all poly-peptides that are able to inhibit the development of an inflammation response.

Moreover, recombinant nucleic acids are also able to encode other interesting biological products such as, for example, markers, products that provide conditional toxicity (for example, a substance of the thymidine kinase type), enzymes, compositions of the extra-cellular matrix, etc.

The present invention promotes activity for local restoration, at non-toxic doses, of these growth factors or of other biological products, and thus promotes improvement in the mechanical and structural properties of tendons and ligaments during the healing process. These different biological products can be utilised either alone or in combinations. The present invention can now demonstrate that it is possible to implant into fibrous tissues of a structure (for example, of a tendon or ligament), genetically modified cells that are capable of providing a polypeptide, and that this polypeptide diffuses or is in contact with the cells present in the tendon (or fibrous tissue).

As has been indicated above, the present invention has the object of utilising tenocytes for the preparation of a composition intended for implantation in man, particularly for the treatment of defects in fibrous tissues such as, for example, ligaments, tendons or skeletal muscle.

The expression "treatment of defects" describes more particularly the restoration of or the compensation for defects, that is to say, specifically the reconstitution, at least partially, of tissues in the areas where they became defective. Preferably, it relates to the utilisation within an autogenous context, that is to say that the biological sample which is used for the production of tenocytes is derived from the subject where it is proposed to administer the tenocyte products. In any event, as indicated above, the

THIS PAGE LEFT BLANK



use of allogenic or xenogenic cells (from the rabbit, horse or pig, etc) can equally be considered for the treatment of human pathological conditions.

More generally, the invention relates to the use of any autologous, allogenic or xenogenic cells for the preparation of a composition intended to be implanted or administered in a tendon or ligament. It concerns more particularly a tenocyte or a fibroblast, cultivated *in vitro*, possibly genetically modified.

In this regard, the invention also relates to a method for restoring tendons, ligaments or muscles *in vivo*, which comprises the administration of a composition of tenocytes into the subject (preferably, man). It can relate to autologous tenocytes, or to allogenic or xenogenic tenocytes, that are preferably multiplied *in vitro*. The tenocytes can also be modified genetically. Preferably, autologous tenocytes are used.

In this regard, the process of the invention advantageously provides for the withdrawal of a healthy sample of the tendon or ligament from the subject, the preparation of tenocytes starting out from the sample, and then the administration into the subject of a composition of tenocytes that has been obtained in this way.

According to another variation, the invention relates to a method for the restoration of tendons or ligaments *in vivo*, which comprises the administration of a composition of fibroblasts into a subject. This can refer to autologous, allogenic or xenogenic fibroblast, that have, preferably been multiplied *in vitro*. In addition, the fibroblasts used can have been genetically modified, preferably for providing a growth factor, or any other nucleic acid that can permit the fibroblasts to acquire the biological properties adapted for use according to the invention, particularly for providing a phenotype, or the characteristics of a tenocyte such as, for example, a gene encoded for a factor that promotes the production of collagen, for a composition of the extra-cellular matrix, for an anchorage factor, etc. Preferably, autologous fibroblasts are used, for example cutaneous fibroblasts.

According to this variation, the process of the invention advantageously provides for the withdrawal of a sample of healthy fibroblasts from the subject, their genetic

THIS PAGE LEFT BLANK

modification *ex vivo*, and then the administration into a tendon or ligament of the same subject of the fibroblasts obtained in this way.

According to another variation, the invention relates to the utilisation of tenocytes or fibroblasts that are autologous, allogenic or xenogenic, for promoting the healing process of torn or ruptured muscles. The rupture of a muscle is, in effect, accompanied by retraction of the two separated (or torn) sections towards the insertion site of the tendon. Experience has shown that with, for example, rupture of the quadriceps, the best available therapy has been, on the one hand, to restrain, to seek to resorb the haematoma, and then on the other hand, to promote healing of the muscle by extension, since any attempts at suturing these muscles have always been unsuccessful. An advantageous application of the invention, therefore, comprises the injection of suspensions of tenocytes or fibroblasts into the heart of the lesion, thereby to accelerate the healing process of the fibres and so to reduce the time required for immobilisation of the muscle.

In the present invention, when allogenic or xenogenic fibroblasts are used, it becomes possible to establish a fibroblast bank.

Various techniques can be used for the implantation procedure, depending on the material implanted (in suspension, mould, etc.).

In this connection, the present invention describes a method for the implantation of cells *in vivo*, into a tendon or ligament, which comprises the injection of cells intra-tendinously or intra-ligamentally.

According to another variation, the injection is administered peri-tendinously or peri-ligamentally, that is to say, into the sheath surrounding the tendon or ligament.

According to another variation, the cells are inserted into the interior of a device that is capable of positioning itself around a tendon or ligament, for enveloping the injured part thereof. This can be carried out with the use of any bio-compatible material (subsequently bio-degradable) that is capable of forming a sleeve around the tendon

THIS PAGE LEFT BLANK

or ligament. The cells are thus maintained in close contact with the tissue and with the treatment area.

The invention also describes the utilisation of a bio-compatible film, particularly one that is capable of being resorbed, for the preparation of a composition, particularly of tenocytes, intended for implantation into cells of a defective tendon or ligament. This concerns, more preferably, tenocytes in liquid solution or in the frozen state, that have been multiplied *in vitro*. Yet more preferably, it refers to autologous tenocytes.

The tenocytes, compositions and methods according to the invention are equally well usable for studying the activity of genes in tenocytes, their differentiation, for the identification of target genes, for screening of the compositions that can modulate the activities of tenocytes or their proliferation, etc.

Other aspects and advantages of the present invention will become evident by the interpretation of the following examples which should be considered as illustrations only and not limiting the scope of the invention.

## LIST OF FIGURES

Fig. 1: Representation of the structure of a tendon

Fig. 2: Schematic view of a transverse section of a tendon

Fig. 3: Evolution over time of transduced tenocytes by the gene LacZ, following retroviral infection

Fig. 4: Evolution over time of the number of tenocytes transduced by the gene LacZ, following retroviral infection (at the ninth passage).

Fig. 5: Evolution over time of the number of tenocytes transduced by the gene LacZ, following retroviral infection (at the 18<sup>th</sup> passage).

THIS PAGE LEFT BLANK

Fig. 6: The amount of beta-galactosidase provided by the transduced tenocytes.

Fig. 7: Tenocytes of the rabbit transduced in vitro by a retro-virus GALV-LacZ

Fig. 8: In vivo transfection of a mouse tendon by the plasmid CMV-LacZ (40 µg) (96 hours after transfer)

Fig. 9: Staining in toto of a mouse tendon, 48 hours after transfection in situ by the plasmid CMV-LacZ (40 µg).

Fig. 10: Results after 48 hours of the implantation into a patellar tendon of the rabbit, of tenocytes modified ex vivo by the plasmid CMV-LacZ.

Fig. 11: Results after 48 hours of the implantation into a patellar tendon of the rabbit, of tenocytes modified ex vivo by the plasmid CMV-LacZ.

Fig. 12: Growth curve representing the first, second and third passages (P1, P2, P3) of primary cultures of tenocytes prepared by dissection and digestion with collagenase of fragments of the human Achilles tendon obtained from a 28-year-old subject. (12a) direct cultures; (12b) cultures after freezing/de-frosting of the cells.

Fig. 13: Microscopic image of human tenocytes transduced by retroviruses coding for the protein LacZ, following colouration with X-gal.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **1. Vectors**

The vectors used *in vitro* were the plasmid and retro-viral vectors

#### **1.1 Plasmids**

THIS PAGE LEFT BLANK



### A plasmid with a gene encoded for $\beta$ -galactosidase

The plasmid used was the CMV-LacZ, which is a DNA-plasmid-modified *Escherichia coli* (pCMV $\beta$ , produced by Clontech®). This plasmid comprises the promoter CMV, derived from the human cyto-megalo-virus, which promotes strong activity by the gene LacZ, the originator of *Escherichia coli*, encoded for  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal). The sequence terminates at a signal for poly-adenylation (poly A) derived from the virus SV 40 (simian virus). The plasmid contains, moreover, an origin of the replication derived from *E.coli* (Col E1 Ori), and a selection gene that promotes resistance to ampicillin (Fig. 3).

The stages in the production of the plasmid CMV-LacZ comprise (8):

- The culture on a selection medium of bacteria that contain the plasmid,
- Extraction of the plasmidic DNA by alkaline lyophilisation,
- Recovery of the bacterial culot,
- Elimination of the DNA bacterial genome,
- Precipitation of the plasmid DNA,
- Purification by a double pressure gradient with caesium chloride (precipitation of the proteins, double ultra-centrifugation over 6 hours at 55,000 rpm and at 20°C, followed by dialysis),
- Precipitation of the plasmid DNA (concentration of the DNA).

### Plasmids with a gene encoded for the green fluorescent protein

Other plasmid structures encoded for a marked gene of the GFP type (green fluorescent protein) have also been used. This type of gene promotes detection by fluorescence under the influence of ultra-violet rays. The plasmids used were the SV40-GFP (the promoter of the Simian Virus 40) and the PET-47. The method of production used was identical to that described above.

## **1.2 Retroviral Vectors**

THIS PAGE LEFT BLANK

Two types of retroviral vectors that transduce the gene nls-LacZ were used. This gene promotes marking, in blue, of the nucleus of transduced cells after staining with X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-b-galactopyranoside). The retro-viruses produced are derived, in some cases, from the murine leukaemia of Moloney (Mo-Mulv) and, in others, from the acute leukaemia of the gibbon (Gibbon Ape Leukaemia Virus (GALV)) (9). The encapsulation lines were, in the first case, the  $\Psi$ crip LLZ ( $\Psi$ crip-LLZ-nis LacZ) and, in the second case, the GALV 18. These lines are described later.

The super-nascent components from the production process of the virus were recovered and purified in a filter of 0.45  $\mu$ m (elimination of the encapsulated cells and of cellular debris), and the quality of the stocks was then verified.

The super-nascent products were separated in sterile water-proof tubes as aliquots, so as to prevent subsequent coagulation. The tubes were then preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2. Cellular Cultures**

### **2.1 Tenocytes**

The tenocytes were isolated from the Achilles tendon of an adult male mouse of the type OF1, SPF (specific pathogen free), about 40 g (IFFA-CREDO®), or from the patellar tendon of an SPF (specific pathogen free), male rabbit of the New Zealand type, about 2.5 kg (ESD®-France). Human tenocytes were obtained in a similar manner.

### **2.2 Encapsulated Lines**

Two types of encapsulated lines were used for the production of retroviral vectors:

The line GALV 18, prepared by F.L.Cosset, who produces the recombinant retro-viruses that have the capsule is that of the virus GALV that is responsible for acute leukaemia in the gibbon. These expressed cells are derived from osteo-sarcoma cells of the type TE 671 that, on the one hand, have been transfected by vectors carrying the gene gag-pol and, on the other hand, the env, to end up, after selection, in the TE

THIS PAGE LEFT BLANK

FLY GA cells, delivering the empty viral particles. After transfection by a vector containing the gene nls-LacZ, the encapsulated cells GALV 18 were obtained.

The encapsulated cells of the type  $\Psi$ crip LLZ ( $\Psi$ crip-LLZ-nis LacZ) are the fibroblasts of the mouse that are producers of recombinant, amphotropic viral particles, having an envelope of the murine leukaemia virus of Moloney.

## 2.3 The Cellular Culture Medium

### The basic medium

Two types were used, namely the DMEM (a medium from Eagle modified by Dulbecco, reference number 41966, Life Technologies®) and the HAM F12 (a medium from Ham, reference number 21765, Life Technologies® (10, 11).

### Supplements:

It will be necessary to add:

- Foetal calf serum (FCS, from the HyClone® Laboratory), inactivated by heat, at 10 p.100 of the volume, or newly born calf serum (NN, HyClone® Laboratory);
- L-glutamine at 4 mM/l (Gibco®);
- A mixture of antibiotics PSN (penicillin, streptomycin, neomycin) at 1X (stock 100X, reference number 15640-022, Life Technologies®);
- Vitamin C (ascorbic acid) at 50 mg/l (Sigma®, reference number 44-03), in certain cases (12).

The rabbit and human tenocytes were cultured in the two types of medium under comparable conditions, supplemented by FCS, with and without vitamin C. The mouse tenocytes were cultured in DMEM supplemented by FCS and vitamin C. During the culture procedure, the cells were seeded on a support of polystyrene culture (Costar®) of which the area varied between 75 and 225 cm<sup>2</sup>. The support was then transferred to an incubator at 37°C in an atmosphere enriched with CO<sub>2</sub> (5% of

THIS PAGE LEFT BLANK

CO<sub>2</sub>). The atmospheres were systematically renewed every 2 to 3 hours. On blending, the cells were separated with the use of trypsin-EDTA (Life Technologies®). A sample was then analysed after staining with trypan blue, in order to determine the cellular concentration, to be able to calculate the total number of cells, and to assess the cellular mortality rate. The rate of re-seeding of the cells was adapted to the type of manipulation used. A number of primary lines of tenocytes (primary cultures) were formed starting from tendon tissue of animal origin.

### **3. Analysis of the transfer of genes in vivo**

#### **3.1 The technique used for staining on slides**

Following extraction from the animals, the tissues were plunged into liquid nitrogen and then transported to the histology laboratory. After insertion in a resin, the tissues were sliced in a microtome into sections 5 to 10 µm thick. The sections of tissue were then placed onto slides. The sections were fixed over 30 minutes with a solution of PBS containing 1% of formaldehyde and 0.2% of glutaraldehyde. After two rinses with PBS, the sections were kept in a solution of X-Gal for 4 hours. The interpretation of the sections was improved by the counter-staining of some sections with HE (haematein-eosin) emphasising the nuclei in the cells and allowing identification of the presence of the infiltration of mononuclear cells.

#### **3.2 Staining technique *in toto***

This technique allows for the detection of β-galactosidase activity by the presence within the monobloc tissue studied of blue coloration that is visible macroscopically. After removal from the animal, the tissues were washed twice in PBS. The fixing was done by plunging the withdrawn “monobloc” twice into a solution of PBS containing 1% of formaldehyde and 0.2% of glutaraldehyde, over 30 minutes. After two rinses with PBS, the tissues were retained in a solution of X-Gal over one complete night, at a temperature of 32°C. After two rinses with PBS, the tissues were placed in paraffin wax. The sections having thicknesses between 5 and 10 µm, were centred in the blue zones and placed onto slides. The counter-staining of some sections with HE allowed the cell nuclei to be emphasised.

THIS PAGE LEFT BLANK



### 3.3 Macroscopic analysis

Examination of the tendon was undertaken during its removal and again after staining of the material *in toto*.

During the removal, the overall structure of the tendon and of the peri-tendon tissues was studied as well as the articulation of the neighbouring structures (inspection of the cartilage, the menisci and the synovial membrane). Any signs of inflammation, modifications in volume or texture of the tendon and the existence of any adhesions were particularly investigated.

After the overall staining, macroscopic analysis of the withdrawn material facilitated a study of the blue staining to be interpreted as an indication of the presence of transduced cells. This analysis was carried out within and around the tendon, while precisely identifying the extent, the location and the diffusion of that staining.

### 3.4 Microscopic analysis

The inclusions of tissue, the sections and the interpretations of the slides were completed. The techniques used involved both the staining on slides (classical technique) and the technique of staining *in toto*.

The analysis of the slides involved the display of blue coloration which signifies the presence of transduced cells in the tendon. The blue colour is restricted to the nuclei that contain the gene *nis-LacZ*, and, to both the nuclear and cytoplasmic presence of the gene *LacZ*. The distribution of the blue zones was noted. Moreover, infiltration of mononuclear cells or any indication of hyper-vascularisation, indicated an inflammatory reaction, when it was identified around the blue zones. The interpretation was facilitated by counter-staining with HE. A study of the injected tendons under the same conditions but without the gene *LacZ* facilitated verification of the absence of endogenous  $\beta$ -galactosidase activity.

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

THIS PAGE LEFT BLANK

## **EXAMPLE 1: THE PRODUCTION AND CULTURE OF TENOCYTES**

This example describes the production and culture of tenocytes obtained initially from fragments of healthy tissue.

After removal of the tendon that was carried out on a subject under aseptic conditions the cells were obtained in two stages:

- The mechanical diminution of the extracted tendon into millimetric fragments with the use of fine scissors. The fragments were then subjected to the culture procedures.
- The enzymatic digestion using collagenase type D with a weak trypsin activity (Boehringer®, ref.no. 1,088,866). A first phase of the digestion utilised a solution of HBSS (equilibrated saline solution by Hanks, Life Technologies®), enclosing 1 mg/ml of collagenase (about 112 U/ml) under a volume equivalent to 5 ml of solution per 0.1 g of tissue for digestion (10). The tube was placed into the incubator at 37°C, on a rotating stirrer, for one hour. A second phase of the digestion involved the use of an enclosing solution of 0.25 mg/ml of collagenase under the same volume. The tube was then placed in an incubator at 37°C O.N (overnight). The following day, the tube contents were passed through a filter with a pore size of 70µm (cell strainer®), and then transferred into a 25 cm<sup>2</sup> flask after two rinses with PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco®).

The primary cultures were treated under the conditions described above. The medium was renewed every 48 hours, and the dividing out was carried out when the cells became confluent.

During the two distinct stages that were undertaken on two different rabbits, the appearance of the first cellular lines was observed from the 13<sup>th</sup> day after the mechanical diminution of the extracted tendons (1/3 of the patellar tendon, that is, about 160 mg). During the association with the enzymatic digestion by the collagenase D, in two other interventions, the first cellular line appeared on about the 4<sup>th</sup> day. The confluence, on a support of 25 cm<sup>2</sup>, was obtained on about the 21<sup>st</sup> day after the

THIS PAGE LEFT BLANK

mechanical diminution of the isolated material, and on about the 16<sup>th</sup> day after the mechanical diminution associated with the enzymatic digestion O.N.

During the two distinct interventions, the mechanical diminution of an Achilles tendon of the mouse, associated with the enzymatic digestion by collagenase D, permitted the isolation of  $5 \times 10^3$  cells from each tendon on the first day (about 25 mg). The confluence on a support of  $25 \text{ cm}^2$ , was achieved in 12 days and a number of cells of the order of  $3 \times 10^6$  cells was obtained in 21 days.

During a number of separate interventions, the mechanical diminution of fragments of human Achilles tendon, in association with enzymatic digestion with collagenase, allowed human tenocytes to be isolated and placed and maintained in culture. The results presented in Fig. 12a demonstrate that human tenocytes, from different passages, exhibit an important capacity for proliferation (expansion) *in vitro*, and allow for a sufficient generation of viable cells to be produced that are biologically functional for therapeutic application.

The tenocytes isolated from the tendons of NZ rabbits were large fusiform cells with fibroblastic appearance.

At the confluence, the cellular density was around  $2.8 \times 10^4$  cells per  $\text{cm}^2$ . This quantity was also obtained on different sizes of supporting material for the cell culture (25 to  $220 \text{ cm}^2$ ), while allowing the cultures to approach the maximum confluence of the monolayer. Apart from the confluence, these cells also developed on superposed layers but this did not allow for satisfactory separation.

The size of the tenocytes was estimated by calculating the value of the surface of the culture support against the number of tenocytes at the confluence. This size was of the order of  $3.6 \times 10^3 \mu^2$ . Taking into account the microscopic observations which indicated that the estimated length by width was around 4:1, the size of the tenocytes was calculated to be about  $120 \mu$  long by  $30 \mu$  wide. However, it was observed that the size and shape of these cells varied in accordance with the degree of confluence and the frequency of dissemination.

THIS PAGE LEFT BLANK

The initial culture trials using variable seeding volumes (from 1/16 of the confluence to 3/4 of the confluence) indicated that the development of the tenocytes seemed to be optimal at a seeding rate of around 1/4 of the confluence. This was evaluated by a semi-quantitative method by observing the time taken for doubling the number and taking account of the frequency of dissemination. In fact, the separations were regular with a frequency less than every 8 days. Apart from this delay, even if it did not occur at the confluence, the tenocytes required an extended time of contact with the trypsin, the cellular mortality rate was important and the dissociation of the tenocytes was of a bad quality.

The time required for cellular doubling was estimated for two tenocyte cultures derived from the same rabbit, continuing for more than 45 days. The culture conditions used were identical in the two trials. The tenocytes were seeded, to 1/4 of the confluence  $7 \times 10^3$  cells per  $\text{cm}^2$ , on a supporting material of  $150 \text{ cm}^2$ , the medium was renewed every two days and the dissemination occurred once a week.

The rabbit tenocytes were at the 9<sup>th</sup> passage in trial 1, and at the 18<sup>th</sup> passage in trial 2. The time taken for doubling the number of tenocytes varied in a significant manner in the same culture and with regular dissemination conditions. The growth rate of the tenocytes, by decreasing the doubling time, tended to increase with the number of passages. The results are presented in table 1.

The human tenocytes were obtained under the same conditions, being derived from human tendons or fragments of human tendons, either from goosefoot tendons, patellar tendons or from the tendon of the minor palm musculature.

## **EXAMPLE 2: FREEZING THE TENOCYTES**

Methods for preserving tenocytes by freezing have been developed in order to provide a simple method for using cells for different experimental purposes without having to recover them by way of new extractions.

THIS PAGE LEFT BLANK



This example demonstrates how primary and secondary tenocytes can be frozen without alteration to their viability.

The freezing procedures were carried out in the presence of DMSO in a medium of  $\frac{1}{2}$  the volume of newly borne calf serum and  $\frac{1}{2}$  the volume of a mixture of RPMI containing 20% of DMSO. The tubes were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  and then in liquid nitrogen. The same positive results can also be obtained by carrying out the freezing of tenocytes in the presence of a medium without DMSO and/or glycerol as described in the text.

All the trials on freezing and de-freezing (about 30 de-freezings) have demonstrated the good tolerance of tenocytes to the freezing procedures used. After de-freezing, the mortality rate was low and the cells recovered their growth characteristics *in vitro* similar to those of non-frozen and similarly derived cells. These results are more interesting because tenocytes are derived from cells with limited life span in which the number of divisions are limited (13). After all, with only a relatively short delay, it is possible to obtain a substantial number of cells which can be frozen for later utilisation. In this connection, Fig. 12b illustrates the survival capacity and growth rate of human tenocytes after freezing/de-freezing. This figure also demonstrates that human tenocytes can be frozen and de-frozen, that these cells remain viable and can be cultured, that they can be multiplied *in vitro* after de-freezing, and that they remain biologically functional.

### **EXAMPLE 3: TRANSFER OF TENOCYTE GENES IN VITRO**

This example demonstrates the possibility of usefully transferring genes in tenocytes *in vitro*. Different techniques can be used for transferring genes *in vitro* (or *ex vivo*). In the examples, the transfer of tenocyte genes has been studied *in vitro* via plasmids or retrovirus.

#### **3.1 Transfer of plasmids**

The plasmids tested were of the type LacZ (CMV-LacZ) and of the type GFP (SV40-GFP and PET 47). The transfections were carried out with 10  $\mu\text{g}$  of DNA into pits of 10

THIS PAGE LEFT BLANK

cm<sup>2</sup> containing  $2 \times 10^5$  tenocytes. The plasmids were used naked or enclosed in PEI (30  $\mu$ l at  $10^{-2}$  M per pit). The success of the transfer was observed by direct examination of the pits, by counting the number of transduced cells after detachment (after staining with X-Gal or counting by FACS) or by the chemo-luminescence technique.

On the 1<sup>st</sup> day, the tenocytes were put to culture on 9 cm<sup>2</sup> supports so as to produce a confluence of 60p x 100 on the following day.

On the 2<sup>nd</sup> day, after removal of the culture medium, a volume of 0.5 ml of a solution of HBSS containing a desired quantity of plasmids, was poured onto the mono-layer of tenocytes. The support was then replaced in the incubator (at 37°C, in 5% of CO<sub>2</sub>), and a volume of 1.5 ml of the medium was added two hours later.

On the 3<sup>rd</sup> day the usefulness of the transfection was evaluated.

The results achieved demonstrate that the transfection of tenocytes *in vitro* by non-viral vectors is possible. In particular, the results obtained demonstrate a level of transfection, calculated for 100 cells in the presence of PEI, of the order of 10%. The activity of  $\beta$ -galactosidase has been calculated in two trials, in 10 cm<sup>2</sup> pits containing tenocytes transfected by 10  $\mu$ g of DNA and of PEI (30  $\mu$ l of  $10^{-2}$  M). This activity was 9 pg and 53.5 pg of  $\beta$ -galactosidase for a control of 0 pg. The transfection by the plasmid SV40-GFP (10  $\mu$ g) enclosed by PEI (30  $\mu$ g of  $10^{-2}$  M) also indicates a transfection calculated by FACS on 1500 cells to be of the order of 24%.

These results demonstrate, therefore, that tenocytes *in vitro* can be transfected by non-viral vectors, particularly by plasmid DNA.

### **3.2 Transfer by a retrovirus**

After their titration onto reference cells, the retroviral vectors were used to infect human, rabbit and mouse tenocytes *in vitro*. The success of the transfer was demonstrated by direct examination of the pits, by counting the transduced cells after separation, or by a chemo-luminescent technique.

THIS PAGE LEFT BLANK

The effect of infection conditions on the success of the transfer was analysed by a study of rabbit tenocytes infected by retroviral vectors of the type GALV, while varying the rate of confluence of the tenocytes and the periodicity of renewal of the viral super-nascence.

The success of the transduction of the retroviruses GALV 18 and  $\Psi$ crip-LLZ was compared by analysis under identical conditions, with the  $\beta$ -galactosidase rate and activity of transduced tenocytes. The rate of activity of the  $\beta$ -galactosidase by a transduced tenocyte was calculated for each of the two types of retrovirus, in relation to the rate of global activity of the total number of transduced tenocytes.

On the 1<sup>st</sup> day, the cells were placed for culture on 9 cm<sup>2</sup> supports in such a manner as to achieve the desired confluence on the following day.

On the 2<sup>nd</sup> day, after removal of the culture medium used, each pit received a volume of 0.5 ml of super-nascence containing the virus, to which had been added 4  $\mu$ l of Polybren (namely, 8  $\mu$ l/ml). The support was then replaced in the incubator (at 37 °C, with 5% of CO<sub>2</sub>), and a volume of 1.5 ml of fresh medium was added into each pit four hours later.

On the 3<sup>rd</sup> day, analysis of the success of the transfer was carried out.

Demonstration of the success of the transfer was carried out either by direct observation of the culture supports (semi-quantitative estimation), or by determination by counting the cells after separation (precise value of the number of cells transduced).

The fixing of cells transduced by the gene GFP was carried out by a solution of PBS containing 1% of para-formaldehyde, and that of cells transduced by the gene LacZ used a solution of PBS containing 1% of formaldehyde and 2% of glutaraldehyde.

## **Results**

THIS PAGE LEFT BLANK

The titration of the super-nascent retroviruses produced by the cells encapsulated with  $\Psi$ crip-LLZ, was carried out on cells 3T3 NIH (seeded with  $2 \times 10^5$  cells in each  $10 \text{ cm}^2$  pit). The titre was of the order of  $3 \times 10^5$  pfu/ml of super-nascent material.

The titration of the super-nascent retroviruses produced by the cells encapsulated with GALV 18, was carried out on HCT 116 cells (seeded with  $5 \times 10^5$  cells per  $10 \text{ cm}^2$  pit). The titre varied between 2 and  $5 \times 10^5$  pfu/ml of super-nascent material.

### **Infection of rabbit tenocytes with retroviral vectors**

#### **The effect of conditions of infection on the rate of viral transduction.**

The rate of transduction *in vitro* of rabbit tenocytes was measured by varying the rate of confluence of the tenocytes and the conditions of contact with the super-nascent viral GALV 18 (Fig. 7). The viral super-nascent material was used in the pure state over 4 hours, either renewed or not. The results were evaluated by manually counting the number of tenocytes transduced in the sample of 500 cells (table II). No transduced tenocyte was found that had not been infected.

The rate of transduction of tenocytes seems to have been optimal at  $\frac{1}{4}$  of the confluence and without renewal of the viral super-nascent material. This rate tended to be reduced with an increase of the confluence of tenocytes and the number of super-nascent renewals.

#### **Comparison of the rate of transduction by the retro-viruses GALV 18 and $\Psi$ crip-LLZ**

The capacity for infection of rabbit tenocytes by retroviral vectors was tested *in vitro* in  $10 \text{ cm}^2$  pits containing  $7 \times 10^4$  cells. The rate of transduction of tenocytes was calculated on samples of 500 cells in 2 trials using the same super-nascent viral material. The rate of transduction was between 0.6% and 0.7% using the retrovirus

THIS PAGE LEFT BLANK



$\Psi_{crip}$ -LLZ, and between 36.6% and 39.8% using the retrovirus GALV 18. In the tests (no pits infected) no tenocyte was transduced.

The activity of the  $\beta$ -galactosidase of transduced tenocytes by these retro-viral vectors, was measured in 10 cm<sup>2</sup> pits under the same procedural conditions. This activity, after infection with the retrovirus  $\Psi_{crip}$ -LLZ was between 106 pg and 166 pg, or about 0.25 to 0.34 pg per transduced tenocyte. After infection by the retrovirus GALV 18, it was between 6274 pg and 8876 pg, or about 0.25 to 0.32 pg per transduced tenocyte. The background activity (non-infected cells) was 5 pg.

### **The kinetics**

The evolution over time of the total theoretical number of transduced tenocytes after infection with retroviral vectors of the type GALV 18, is presented in the table III. The results are derived from two trials using infected tenocytes from passage 9 (trial 1) and passage 18 (trial 2). By calculation of the exponential evolution, the results are expressed as the log of the number of cells obtained, and is represented in the form of a curve (Fig. 3). The slope of a curve is calculated for each trial, and permits an understanding of the kinetics and extrapolation of the results.

The evolution of the rate of cell transduction was analysed in two trials using tenocytes from infected rabbits by the retroviral vector of the type GALV, at the 9<sup>th</sup> passage (Fig. 4) and at passage 18 (Fig. 5). The results, represented as curves, were expressed by means of two measurements. The degree of confidence had a value of a deviation type.

The presence of a trans-gene in the tenocytes was also significant 77 days after cessation of the infection. The rate of transduction of the tenocytes was relatively stable with a tendency to increase.

### **Infection of mouse tenocytes with retroviral vectors**

THIS PAGE LEFT BLANK

The infection of mouse tenocytes by the retrovirus  $\Psi$ crip-LLZ was tested *in vitro* on cells at  $\frac{1}{4}$  of the confluence with the use of pure, super-nascent viral material over 4 hours. During the infection of the  $10\text{ cm}^2$  pits that contained  $1.4 \times 10^5$  tenocytes, the number of transduced tenocytes was 245 per ml of the pure viral super-nascent material.

### **Infection of human tenocytes with a retrovirus**

Human tenocytes in culture (passage P2) were incubated in the presence of super-nascent retrovirus GALV 18, containing the gene nls-LacZ, under the conditions described above. Three days after infection, the cells were fixed in formaldehyde and stained with X-gal for identification of the activity of the gene LacZ.

The results obtained are presented in Fig. 13, and demonstrate a heightened efficiency of transduction of human tenocytes. Thus, these results show that human tenocytes in culture can be modified genetically in a useful manner, with the use of a retrovirus, and that they can thereby acquire the advantageous properties for therapeutic use in accordance with the present invention. These results can equally well be transposed for direct genetic modification *in vivo*.

### **Constitution of a line transduced by the gene nls-LacZ**

Tenocytes derived from patellar tendons of the New Zealand rabbit, were infected with retroviral vectors of the type GALV 18, carrying the gene nls-LacZ.

The conditions of the infection comprised the seeding of tenocytes at  $\frac{1}{4}$  of the confluence, in a  $150\text{cm}^2$  flask, then their infection over 4 hours by a super-nascent pure viral that is non-renewed. The medium, added at 4 hours, contained DMEM supplemented by vitamin C.

The cultures were then transferred to  $150\text{ cm}^2$  flasks with a separation to  $\frac{1}{4}$  of the confluence every week. During each separation, examination of a sample of cells allowed the total number of cells obtained to be determined. The number of cells that

THIS PAGE LEFT BLANK

comprised the transgene was measured after staining with X-Gal, and after two measurements each carried 500 cells.

These lines, at passages 9 and 18, were passed, after infection with vectors of the type GALV 18, for analysis of the evolution in that time of the number of transduced cells as well as of the proportion of cells in the heart of the culture, the selection of transduced cells being impossible with the vector GALV 18. The cultures were separated once every week to  $\frac{1}{4}$  of the confluence in the 150 cm<sup>2</sup> supports. During the separation, the number of cells used were counted, not taking into account the living cells, after staining with Trypan blue. The total number of cells obtained in one week was measured after discarding the dead cells in the culture, but taking into account the dead cells during the separation. The manual count of cells was carried out by two observers independently, on the basis of one sample of the cellular suspension. The evolution of the theoretical total number of tenocytes could be calculated and represented by means of a curve. The percentage of transduced cells was measured after staining with X-Gal, by manually counting two samples of 500 elements each. The repetitive number of transduced cells counted confirmed the reliability of this count, undertaken over a period in excess of 45 days, starting from two transduced lines.

#### **EXAMPLE 4: TRANSFER OF GENES INTO TENOCYTES *IN VIVO***

This example demonstrates the possibility of transferring recombinant nucleic acids into tenocytes *in vivo*. In particular, this example demonstrates the possibility of undertaking a non-viral transfer *in vivo*, particularly by means of naked DNA.

In this example, the trials of transfection by plasmids was carried out *in vivo* into Achilles tendons.

After determination of the injectable volume required for the mouse Achilles tendon (< or equal to 40 µl), the transfer trials were carried out *in situ* by injection of 20 and 40 µg of naked plasmids in order to study the possibility of transfection *in vivo* and to evaluate the time required for establishment of the transgene. The trials were carried out in order to facilitate the success of the transfer. Different conditions for the transfer were analysed while varying the formulation of the plasmid (naked or enclosed in PEI), the

THIS PAGE LEFT BLANK

quantity injected (between 3.5 and 40 µg) and the volume injected (from 0.5 to 40 µl). The injection was carried out per-cutaneously, in the open-air.

The results of these transfections were examined qualitatively, macroscopically and histologically, as well as quantitatively by measurement of the β-galactosidase activity.

One trial of the transfer *in situ* was carried out by injection of 100 µg of naked plasmids into the Achilles tendon in order to study the possibility of transferring *in vivo* in the rabbit.

The tolerance of transfections was studied macroscopically and by histological examination particularly using counter-staining of the slides with HE.

#### **4.1 Animal models**

The 1<sup>st</sup> model used was the male adult mouse, type OF1, SPF (specific pathogen free), weighing 40 g (IFFA-CREDO®). The anaesthesia was carried out with the use of Avertine® (tri-bromo-ethanol, 25 mg/ml) in a dose of 250 mg/kg, being about 400 µl administered by the intra-peritoneal route (IP). The mouse was sacrificed by cervical dislocation.

The 2<sup>nd</sup> model used was the male, 4-week-old New Zealand rabbit, weighing 2.5 kg (ESD 01-France). The anaesthesia was carried out with the use of Hypnovel® 5 mg (1 ml) administered intramuscularly and of Ketalar® (ketamine) in a dose of 80 mg/kg administered IM. The sacrifice was undertaken by injection IV of a lethal dose (50 mg) of Nesdonal® (thiopental).

#### **4.2 Injection of naked or enclosed plasmids**

The plasmid used for transference *in vivo* was the CMV-LacZ. A non-LacZ plasmid (irrelevant), for example a GFP plasmid, was used as negative control. In trials with the mouse, the plasmids were used at different concentrations (from 1 µg to 7.25 µg/µl) and at different volumes (from 0.5 to 40 µl). For the rabbit, 100 µg to 1 µg/µl of plasmid

THIS PAGE LEFT BLANK



were used. The plasmids were used alone (naked plasmids) or in combination with PEI.

The injection was carried out into and parallel to the tendon in an ascending manner, either per-cutaneously or after cutaneous incision to allow visual control of the position of the needle. Syringes delivering micro-volumes were used (Hamilton®). A 1<sup>st</sup> series of per-cutaneous injections with methylene blue diluted to 1/10 were carried out in order to determine the maximum admissible volume in respect of the Achilles tendon of the mouse, without causing substantial diffusion.

### **4.3 Results**

#### **Transfection *in vivo* into the mouse Achilles tendon**

An initial series of injections of naked plasmid CMV-LacZ was carried out with the aim of evaluating the possibility of transfection *in situ*. The activity of the plasmids was analysed at 48 and 96 hours after per-cutaneous injection of the naked plasmids CMV-LacZ into the Achilles tendons of two mice.

It became clear that the transfer after injection of 40 µg of DNA seemed better than after the injection of 20 µg of DNA. The trans-gene was visible at J2 and at J4. The transfer seemed to be juxta-tendinous and not present in all sections. Examination of two tendons not injected with the plasmid CMV-LacZ, demonstrated the absence of any endogenous β-galactosidase activity.

The feasibility of transferring at least the plasmid CMV-LacZ *in situ* was proven, the 2<sup>nd</sup> stage being the study of the duration of activity of the trans-gene. The activity of the gene LacZ was analysed at J2, J4 and J8 in a series of nine mice. One per-cutaneous injection of 40 µg of naked CMV-LacZ (1 µg/µl) was undertaken into the right tendons while one per-cutaneous injection of 40 µg of naked non-LacZ (irrelevant) plasmid DNA (1 µg/µl) was undertaken into the left Achilles tendons.

The histological study was undertaken at three intervals with staining with X-Gal on the slides of three mouse tendons. Examination of transverse serial sections showed the

THIS PAGE LEFT BLANK

presence of a marker on the right tendons (on a part of the section of each tendon) and the absence of a marker on all the sections of the left tendons providing negative evidence. Exhaustive examination of the tendons by transverse sections proved to be impossible because it would have been necessary to make 400 sections of each mouse tendon.

Examination of the tendons of six mice by staining with X-Gal *in toto*, permitted macroscopic sight of a blue zone at J2 and J8. Transverse sections, orientated onto the blue zones, provided for recovery of the bands of transduced cells.

To summarise, a transgene is only recoverable in tendons injected with plasmid CMV-LacZ at the three separations of J2, J4 and J8, and the trans-genic activity was peritendinous. No inflammatory reaction was seen to occur, either macroscopically or histologically.

#### **Comparison between an injection of naked CMC-LacZ plasmid and one that is enclosed with PEI**

The influence of a facilitating agent (PEI) on the transfer *in vivo* has been evaluated. This study, carried out previously, has analysed the results obtained by injecting plasmid CMV-LacZ, naked and enclosed by PEI, into 4 Achilles tendons of the mouse. The plasmids were injected in the same volumes (40  $\mu$ l) after providing a controlling view of the site by a cutaneous incision.

It was clear that during the injections, with the use of more than 10  $\mu$ l of liquid there was leakage from the tendon. Also, the needle should remain in place for at least one minute in order to avoid reflux during withdrawal of the needle.

The technique for staining X-Gal *in toto* undertaken over 48 hours, showed on the transverse sections centred macroscopically onto the blue zones of the tendons, that there was  $\beta$ -galactosidase activity present in the deep regions of the tendons (Fig. 9). The difference in transfection intensity between naked plasmids and such enclosed by PEI, was not able to be quantified on histological sections. The staining, applied equally

THIS PAGE LEFT BLANK

to peri-tendinous tissue for investigation of diffusion, showed the absence of  $\beta$ -galactosidase in peri-tendinous areas of the tendons.

### **Injection of naked CMV-LacZ after cutaneous incision**

The presence of a cutaneous incision during the injection of plasmids, permits visual control of the injection procedure, as has been demonstrated in the preceding study. After validating this technique, analysis of the activity of the transgene was undertaken on the tendons of three mice. These tendons were injected with 40  $\mu$ g of naked plasmid CMV-LacZ into the right side (under 40  $\mu$ l) and with 40  $\mu$ g of non-LacZ plasmid into the left side (under 40  $\mu$ l). The transfer of gene LacZ was analysed by staining with X-Gal *in toto*, that is to say, onto the entire excised tendon (muscle-tendon and peritendinous tissue), over 48 hours. The macroscopic results were very positive in respect of three right-hand tendons and negative in respect of the left-hand tendons that served as controls (Fig. 9). The blue transduction zones were very restricted and localised on the tendon and para-tendon. The histological sections, of good quality, demonstrated the presence of trans-gene in the interior of the tendon, proving that transduction of intra-tendinous cells was possible by means of an adapted injection technique. In all cases, the transfection zones were localised, that is, limited to the trauma caused by the pointed edge of the sloped edge of the needle (Fig. 9).

The intensity of the activity of the gene LacZ has been studied over 48 hours from the transfection *in situ* of tendons of one series of four mice. The tendons were injected, under visual control, with a volume of 20  $\mu$ l containing 40  $\mu$ g of DNA (2  $\mu$ g/ $\mu$ l). Six of the eight tendons were injected with the plasmid CMV-LacZ, the two others with a non-LacZ plasmid (control). After removal at 48 hours, the tendons were randomly separated into two groups, each group having one control tendon. The 1<sup>st</sup> group was examined by a staining technique with X-Gal *in toto*, while the 2<sup>nd</sup> group was examined with the use of a chemo-luminescence kit that allowed quantification of the activity of  $\beta$ -galactosidase. The aim of the study using these two techniques in parallel, was to verify that the technique using the kit, analysing only the tendon, was carried out on the tendons actually transduced as could be demonstrated by macroscopic and histological studies undertaken on the other group of tendons.

THIS PAGE LEFT BLANK

The staining technique with X-Gal *in toto*, a good quality technique, has confirmed the presence of transduced cells in the tendons injected with the plasmid CMV-LacZ and that the control tendon was negative.

The quantification of the  $\beta$ -galactosidase activity by means of the chemo-luminescent kit showed that there is a close degree of activity in the three tendons injected with plasmid CMV-LacZ (table IV). Each value was determined twice, the conversion was carried out starting from the range having a coefficient of determination  $R^2$  equal to 0.998, which demonstrates the precision of the conversion calculations.

### **Injection of naked CMV-LacZ plasmids at different volumes and concentrations**

Different possible formulations for the plasmids have been analysed with a view to optimising the *in situ* transfer. The aim was firstly, to study the effect of the injected volume on the given concentrations. In order to preserve a sufficient quantity of plasmids, the maximum injectable volume into one tendon being 10  $\mu$ l, the concentration used was 7.25  $\mu$ g/ $\mu$ l. Different conditions of *in vivo* transfection were studied 48 hours after the injection of naked plasmid CMV-LacZ in a series of five mice. Nine tendons were injected with a variable volume between 0.5 and 8  $\mu$ l of plasmid CMV-LacZ. The last tendon serving as control was injected with a non-LacZ plasmid. The results of the transfections were evaluated by measurement of the  $\beta$ -galactosidase activity with the use of the chemo-luminescence kit. The results of the two distinct measurements, undertaken at different times, demonstrated the variation in the value of each sample (table V).

### **Transfection in vivo in the Achilles tendon of the rabbit**

A study of the distribution of the gene LacZ after pure intra-tendinous injection with 100  $\mu$ g of naked CMV-LacZ plasmid with a dose of 1  $\mu$ g/ $\mu$ l into two Achilles tendons in the rabbit, demonstrated the usefulness of plasmid transfer. The evidence for the transfer was provided by the staining standard for X-Gal. The histological transverse sections prepared after 24 hours, were directed at the injected zone. The transfer was strictly intra-tendinous and no staining was observed outside the target area of the injection.

THIS PAGE LEFT BLANK



Taking into account the large size of the tendons, only a certain number of sections could be prepared.

### **Analysis of the tolerance of transfections *in vivo***

With the microscopic examination of the mouse or rabbit tendons, there was no sign of inflammation either within the tendon, on the tissues surrounding the tendons or in the articulation of the ankle.

With microscopic analysis, enhanced by counter-staining with HE, no infiltration by mononuclear cells was observed around the tenocytes transduced by the gene LacZ.

Consequently, the assemblage of results obtained demonstrates that the transfer of plasmids *in vivo* within tenocytes is possible either with naked DNA or in association with a facilitating agent (of the cationic polymer type), that the transfer promotes the activity of a recombinant gene within the tenocytes *in vivo*, and that the transfer does not induce inflammation around the transduced cells nor any modification in volume of the tendon.

### **EXAMPLE 5. IMPLANTATION IN VIVO OF TENOCYTES GENETICALLY MODIFIED IN VITRO**

The trials on the transfer of genes were carried out on tendons via the intermediation of genetically modified homologous tenocytes *ex vivo* (particularly transduced by the retrovirus GALV 18).

A 1<sup>st</sup> trial studied the possibility of detecting the early activity of the transgene, during the re-implantation of  $5 \times 10^6$  transduced tenocytes. The following trials evaluated the length of time taken for the activity of the transgene, by means of an analysis over different periods (from 24 hours to 26 days) following implantation of  $5 \times 10^6$  of transduced tenocytes. The tolerance to transfer *ex vivo* was studied particularly carefully during macroscopic and histological examinations.

### **5.1 Animal model**

THIS PAGE LEFT BLANK

Male New Zealand rabbits, seven years old and weighing 2.5 kg (ESD 01-France) were used. The anaesthesia was carried out with the use of Hypnovel® 5 mg (1 ml) administered IM, and of Ketalar® (ketamine) in a dose of 80 mg/kg via IM. The sacrifice was carried out by IV injection of a lethal dose (50 mg) of Nesdonal® (thiopental).

## **5.2 Cellular preparations**

The implanted or re-implanted cells used were the autologous or homologous (allogenic) tenocytes. A variable number of tenocytes (from  $2 \times 10^6$  to  $5 \times 10^6$  cells), contained in a volume of 250  $\mu$ l of a solution of DMEM, were used. The tenocytes were freshly infected, or derived from a transduced line, with vectors of the type GALV 18 carrying the gene nis-LacZ.

## **5.3 Injection of the cells**

The operative zone was prepared in respect of aseptic surgical conditions. The injection of the cellular preparation was carried out into the tendon or into its covering, parallel to the tendon and after a cutaneous incision that allowed visual control of the intervention. A 1 ml syringe of the "insulin" type was used with a needle of 22 G. The cutaneous incision was closed with a simple nylon thread suture.

## **5.4 Results**

The trials of transfer *ex vivo* were carried out on the patellar tendons of a 4-week-old male rabbit of the New Zealand type.

### **Study on the prompt transfer procedure**

With the aim of evaluating the possibility of transferring a gene *ex vivo*, the introduction of a transgene into a healthy patellar tendon was analysed in the short term. The re-implantation into each of the patellar tendons of the rabbit of  $5 \times 10^6$  homologous tenocytes was studied after a delay of 24 hours. Amongst the tenocytes of passage 18,

THIS PAGE LEFT BLANK

freshly infected, 60 per 100 had been transduced. The implantation of these tenocytes was carried out into intact tendons after cutaneous incision avoiding the covering. The 1<sup>st</sup> side was injected into the covering of the tendon, the 2<sup>nd</sup> into the tendon itself.

Macroscopic and histological analysis (with staining of the slides), undertaken at 24 hours, indicated the absence of cutaneous adhesions and of any inflammation reactions articular or extra-articular). The gene marker was very clearly discernable on the histological sections using a staining with X-Gal on the slides (Fig. 10).

### **Study on duration of the detection of the transgenes**

#### Analysis of the transfer of J2 to J8

The analysis carried out in the short term having demonstrated the possibility of transferring *ex vivo* and its detection by histological technique using staining on the slides, a second study was done that comprised examination of the time taken by the activity of the transgene within the intact tendons of the rabbit. The re-implantation into each of the patellar tendons, of  $5 \times 10^6$  tenocytes was studied at delays of 2, 4 and 8 days. Amongst the tenocytes (at passage 28 starting from an infected line at passage 18), 88 per 100 had been transduced. The implantation of these tenocytes was carried out into the interior of the tendon, after cutaneous incision avoiding the covering. The 1<sup>st</sup> side was injected with transduced tenocytes, the 2<sup>nd</sup> with non-transduced tenocytes.

Macroscopic analysis showed that cutaneous adhesion was absent and there was no inflammation reaction (either articular or extra-articular). Thickening of the covering was observed up to the 4<sup>th</sup> day.

Histological analysis using staining with X-Gal on the slides showed the presence of marker genes at J2, J4 and J8 (Fig. 10). All sections of the tendons having received the transduced tenocytes, exhibited the presence of a marker gene, whereas the sections of control tendons showed an absence of that gene. The transduced cells were less visible and seemed to be dispersed at J8, analysis at high magnification, however, showed the persistent presence of the transgene.

THIS PAGE LEFT BLANK

The injection of  $5 \times 10^6$  homologous tenocytes was studied on four intact patellar tendons after a delay of 48 hours. Amongst these tenocytes (at passage 32, starting at an infected line at passage 18), 89 per 100 had been transduced. The implantation of these tenocytes was carried out into the interior of the tendon after cutaneous incision avoiding the covering. The 1<sup>st</sup> side was injected with transduced tenocytes, the 2<sup>nd</sup> side with non-transduced tenocytes.

Macroscopic examination of the activity of the transgene allowed the transduction zone to be localised on the tendon and the sections to be orientated. The transduced tenocytes were located inside the tendon but also in its covering (Fig. 11). There was no observed transduction on the control tendon, nor was there any in the covering nor inside the tendon (Fig. 11). Examination of the peri-tendinous tissue in a search for any diffusion of marker beyond the covering, showed it to be absent. The technique of staining *in toto* proved this to be of good histological quality and allowed for staining with HE. The sections of control tendons confirmed the absence of any transgenes.

Using the chemo-luminescent technique,  $\beta$ -galactosidase activity measured in a transduced tendon was 4070 pg against a control at 0 pg.

#### Analysis of the transfer of J8 to J26

After improving the analytical methods of transfer *ex vivo*, it was interesting to study the duration of activity of the trans-gene in the intact tendons after 8 days. The re-implantation of  $5 \times 10^6$  homologous tenocytes via the patellar tendon, was studied at delays of 8, 14 and 26 days. Amongst these tenocytes, (at passage 33, starting at an infected line at passage 18), 94 per 100 were transduced. The implantation was carried out into the interior of the tendons after completing a cutaneous incision avoiding the covering. The two sides were injected with transduced tenocytes. The control without staining were Achilles tendons from the same rabbit, injected with non-transduced tenocytes.

An analysis was carried out simultaneously with the 1<sup>st</sup> side, the staining technique *in toto*, and the 2<sup>nd</sup> side, the quantification of the  $\beta$ -galactosidase activity by the chemi-luminescence kit.

THIS PAGE LEFT BLANK



Macroscopic analysis demonstrated the absence of any cutaneous adherence and of any inflammation reaction (articular or extra-articular). Macroscopic viewing of the transgene activity was possible on the tendon up to J14.

Histological analysis using the *in toto* staining technique, showed the persistence of the marker gene at J8, J14 and J26 on the sections centred on the macroscopically visible stained zone. Nine sections were prepared for each tendon. All the sections of tendons that had received transduced tenocytes, exhibited the presence of marker gene, whereas those from control tendons showed an absence of this gene. The dispersion of transduced cells in the tendon was increased at J8 and J26. The quality of the sections after staining *in toto* was comparable to that of the classical technique, as was demonstrated on the slides prepared after the 8<sup>th</sup> day of decline. After the last delay, images of reactions to foreign bodies were visible around the mass of  $\beta$ -galactosidase.

#### Analysis of the tolerance to gene transfer ex vivo

With macroscopic examination of patellar tendons after implantation of transduced tenocytes, no sign of inflammation was observed at the level of the tendon, of the peritendinous tissue or of the knee articulation.

With microscopic examination, improved by counter-staining with HE, no infiltration by mono-nuclear cells was seen around homologous tenocytes, whether transduced or not, in the early stages.

### **SUMMARY**

By way of summary, the results obtained particularly demonstrate that:

- The tenocytes can be isolated from tendons, then cultured *en masse* with the aim of undertaking their transplantation;
- The tenocytes can be transduced very effectively *in vitro* by means of using the retrovirus vector GALV 18;

THIS PAGE LEFT BLANK

- The activity of transgenes in tenocytes transduced by a retroviral vector is stable in a culture beyond 45 days;
- The transfer of a gene is possible in vivo by means of naked or enclosed plasmids of PEI as intermediary, which have a persistent activity for 8 days;
- The activity of a transgene in vivo, after implantation of transduced tenocytes into tendons, is still present by the 26<sup>th</sup> day.

THIS PAGE LEFT BLANK

## REFERENCES

1. Catonné et al., Catonné Y, Saillant G. ed. Lésions traumatiques des tendons chez le sportif Paris :Masson, 1992 : 3-8.
- 5 2. Christel P., J. Traumatol.Sport. 14 (1997) 66
3. Imbert JC, J. Traumatol.Sport. 14 (1997) 107
4. Poddevin et al., Rev.Chir.Orthop.Rappar.Apar.Mot 81 (1995) 410
5. Natsuume et al., J. Orthop. Res 15 (1997) 837
6. Panossian et al., Clin. Orthop. 342 (1997) 173
- 10 7. Lee et al., Orthop. J. 18 (1998) 19
8. Sambrook et al., Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd edition New York: Cold Spring Harbor Lab. Press 1989
9. Miller et al., J. Virol 65 (1991) 2220
10. Bernard-Beaubois et al., Cell. Biol. Toxicol. 13 (1997) 103
- 15 11. Cao et al., Transplant. Proc. 26 (1994) 3390
12. Kao et al., Arch. Biochem. Biophys. 173 (1976) 638
13. Anselme et al., Rev.Chir.Orthop.Rappar.Apar.Mot 82 (1996) 709

THIS PAGE LEFT BLANK

**Table 1: Time taken for doubling the number of tenocytes of the rabbit in vitro**

Doubling Time (hours)

Number of Separations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Trial 1	105	325	95	247	297	220	319	198	121	79
Trial 2	277	80	58	59	73	54	40			

**Table II: Degree of infection of the rabbit tenocytes as a function of their degree of confluence and renewal or not of the viral supernascent material**

Single Supernascent	Supernascent	Supernascent
	Renewed once	Renewed twice

**Table III: Evolution of the total theoretical number of transduced tenocytes**

Delay Time	Number of	Number of
(days)	Tenocytes (exp.1)	Tenocytes (exp.2)

**Table IV: Rate of  $\beta$ -galactosidase detected by the chemo-luminescent kit at 48 hours**

THIS PAGE LEFT BLANK



Plasmid  
Measurement

**Table V: Rate of  $\beta$ -galactosidase after transfer in situ by the naked plasmid CMV-LacZ**

**Note:** Two measurements (1 & 2) carried out at different times

THIS PAGE LEFT BLANK

## CLAIMS

1. A composition characterised in that it comprises autologous and/or allogenic tenocyte cells of human origin.
2. A composition according to Claim 1, characterised in that it comprises a culture of autologous and/or allogenic tenocytes *in vitro* or *ex vivo*.
3. A composition according to Claim 1 or 2, characterised in that it comprises genetically modified autologous and/or allogenic human tenocytes.
4. A composition according to any one of Claims 1 to 3, characterised in that it is contained in a type of device as an ampoule, syringe, phial, pocket or box.
5. A composition according to any one of Claims 1 to 4, characterised in that it comprises tenocytes prepared from a tendon.
6. A composition according to Claim 5, characterised in that it comprises tenocytes derived from a tendon of a muscle of the goosefoot region, from a tendon of a small palm muscle, from the tendon of the plantar spindle muscle, from the tendon of the anterior fibula muscle, from the quadricipital tendon, from the patellar tendon or from the Achilles tendon.
7. A composition according to any one of the Claims 1 to 4, characterised in that it comprises tenocytes prepared from a ligament.
8. A composition according to any one of the Claims 1 to 4, characterised in that it comprises tenocytes prepared from an apo-nerve.
9. A composition characterised in that it comprises genetically modified human or equine tenocytes and an excipient.
10. A composition according to Claim 9, characterised in that it comprises genetically modified human tenocytes.

THIS PAGE LEFT BLANK

11. An isolated and genetically modified tenocyte cell, characterised in that it contains a re-combinant nucleic acid coded with a growth factor and/or a factor inhibiting an inflammation reaction.
12. A composition characterised in that it comprises frozen tenocytes.
13. A composition for the preservation of tenocytes, comprising tenocytes and at least one compound selected from:
  - a. dimethyl sulphoxide
  - b. a modified gelatin
  - c. a polysaccharide, or
  - d. glycerin
14. The use of human tenocytes for the preparation of a composition intended for implantation *in vivo*.
15. The use according to Claim 14, characterised in that the tenocytes are used for the preparation of a composition intended for use in a therapeutic treatment method, for diagnostic or surgical use on the human body.
16. The use according to Claim 15, characterised in that it comprises the use of autologous, allogenic or xenogenic tenocytes.
17. The use according to any one of the Claims 14 to 16, characterised in that tenocytes cultured *in vitro* are used.
18. The use according to any one of the Claims 14 to 17, characterised in that genetically modified tenocytes are used.
19. The use according to Claim 18, characterised in that tenocytes are used that contain a recombinant nucleic acid coding a growth factor and/or a factor inhibiting an inflammation reaction.

THIS PAGE LEFT BLANK

20. A process for genetically modifying a tenocyte *in vitro* or *ex vivo*, characterised in that it comprises placing a tenocyte into contact with (i) naked DNA, or (ii) a pseudo-typed recombinant retro-virus having a GALV covering.
21. The use of a composition comprising (i) naked DNA, or (ii) a pseudo-typed recombinant retro-virus having a GALV covering, for the preparation of a composition intended for transfer of this DNA into the tenocytes *in vivo*.
22. The use of a recombinant nucleic acid for the preparation of a composition intended for genetic modification *in vivo* of a human tenocyte.
23. The use according to Claim 14, of a population of autologous, allogenic or xenogenic tenocytes or fibroblasts for the preparation of a composition intended for implantation or administration into a tendon or ligament.
24. The use according to Claim 14, of a population of autologous, allogenic or xenogenic tenocytes or fibroblasts for the preparation of a composition intended for promotion of healing of a torn or ruptured muscle.
25. A process for the production of tenocytes, characterised in that it comprises:
- The removal of a biological tissue fragment that comprises tenocytes, preferably of human origin;
  - The treatment of this fragment for the disassociation of tenocytes, in the presence of a collagenase, and
  - The placing of tenocytes into culture and multiplying them *in vitro* by successive passages, preferably by seeding to a density corresponding to one quarter of the confluent medium.
26. A process according to Claim 25, characterised in that it comprises a stage in which the tenocytes are frozen, preferably in a medium according to Claim 13.

THIS PAGE LEFT BLANK



27 A process according to Claim 25 or 26, characterised in that it comprises a stage for the genetic modification of the tenocytes, preferably according to Claim 20.

THIS PAGE LEFT BLANK

**MODIFIED CLAIMS**

[As received from the International Bureau on 7 March 2001 (07.03.01); original Claims 1 – 27 are replaced by new Claims 1 – 26 (3 pages)]

1. A composition characterised in that it comprises autologous and/or allogenic tenocyte cells of human origin.
2. A composition according to Claim 1, characterised in that it comprises an in vitro or ex vivo culture of autologous and/or allogenic tenocytes.
3. A composition according to Claim 1 or 2, characterised in that it comprises genetically modified autologous and/or allogenic human tenocytes.
4. A composition according to any one of the Claims 1 to 3, characterised in that it is contained in such a type of device as an ampoule, syringe, phial, pocket or box.
5. A composition according to any one of the Claims 1 to 4, characterised in that it comprises tenocytes prepared from a tendon.
6. A composition according to Claim 5, characterised in that it comprises tenocytes prepared from the tendon of a muscle in the region of the goosefoot, from the tendon of the small palm muscle, from the tendon of the plantar spindle muscle, from the tendon of the anterior fibular muscle, from the quadriceps tendon, from the patellar tendon or from the Achilles tendon.
7. A composition according to any one of the Claims 1 to 4, characterised in that the tenocytes have been prepared from a ligament.

THIS PAGE LEFT BLANK

8. A composition according to any one of the Claims 1 to 4, characterised in that the tenocytes have been prepared from an apo-nerve.
9. A composition according to Claim 3, characterised in that it comprises genetically modified human tenocytes and an excipient.
10. A composition according to Claim 3 or Claim 9, characterised in that it comprises genetically modified tenocytes supporting a recombinant nucleic acid coded for a growth factor and/or a factor inhibiting an inflammation reaction.
11. A composition according to any one of the Claims 1 to 10, characterised in that it comprises frozen tenocytes.
12. A composition according to any one of the Claims 1 to 11, characterised in that it is used for the preservation of tenocytes, comprising tenocytes and at least one compound selected from:
  - a. Methyl sulphoxide
  - b. A modified gelatin
  - c. A polysaccharide, or
  - d. Glycerin
13. The use of human tenocytes for the preparation of a composition intended for implantation *in vivo*.
14. The use according to Claim 13 of tenocytes for the preparation of a composition intended for use in a therapeutic treatment method, for diagnostics or surgical interventions on the human body.
15. The use according to Claim 14, characterised in that it comprises autologous, allogenic or xenogenic tenocytes.

THIS PAGE LEFT BLANK

- 16 The use according to any one of the Claims 13 to 15, characterised in that it comprises tenocytes cultured *in vitro*
17. The use according to any one of the Claims 13 to 16, characterised in that it comprises genetically modified tenocytes.
18. The use according to Claim 17, characterised in that it comprises tenocytes containing a recombinant nucleic acid coded for a growth factor and/or a factor inhibiting an inflammation reaction.
19. A process for the preparation of a composition claimed in any one of the Claims 3 or 9, characterised in that it comprise *in vitro* or *ex vivo* contact between a tenocyte and (i) naked DNA or (ii) a recombinant retrovirus pseudotype having a GALV covering.
20. The use of a composition comprising (i) naked DNA or (ii) a recombinant retrovirus pseudo-type with a GALV covering, for the preparation of a composition intended for transfer *in vivo* of this DNA into human tenocytes.
21. The use of a recombinant nucleic acid form the preparation of a composition intended for the *in vivo* modification of a human tenocyte.
22. The use according to Claim 13, of a population of autologous, allogenic or xenogenic tenocytes or fibroblasts, for the preparation of a composition intended for implantation or administration in a tendon or ligament.
23. The use according to Claim 13, of a population of autologous, allogenic or xenogenic tenocytes or fibroblasts for the preparation of a composition intended for promotion of healing torn or ruptured muscles.
24. A process for the production of a composition according to Claim 1, comprising:

THIS PAGE LEFT BLANK



- The extraction of a fragment of biological tissue comprising tenocytes of human origin.
- The treatment of a fragment of biological tissue for dissociation of tenocytes in the presence of a collagenase, and
- The subjecting of the tenocytes to a culture procedure, and their multiplication *in vitro* by successive passages, preferably by seeding to a density corresponding to about a quarter of the confluence.

25. A process according to Claim 24, characterised in that it comprises a stage for the genetic modification of tenocytes, preferably according to Claim 12.

26. A process according to Claim 24 or 25, characterised in that it comprises a stage of genetic modification of the tenocytes, preferably in accordance with the Claim 19.

THIS PAGE LEFT BLANK

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE LEFT BLANK